

**Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion
am Knockout-Mausmodell
der endothelialen sowie der induzierbaren
Stickstoffmonoxid-Synthase**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Daniela Schüler, geborene Buchspies
aus Fulda

Gießen 2017

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Medizinische Klinik und Poliklinik II
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. W. Seeger -
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. N. Weißmann

Gutachter: PD Dr. phil. nat. C. Troidl

Tag der Disputation: 15. Juni 2018

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1. Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV)	1
1.2. Physiologischer und pathophysiologischer Stellenwert der HPV	2
1.3. Mechanismen und Mediatoren der akuten und der protrahierten hypoxischen Vasokonstriktion	4
1.4. Chronische Hypoxie	5
1.5. Die Rolle der Stickstoffmonoxid-Synthasen bei der HPV	6
1.6. Möglichkeiten der pharmakologischen Modulation der HPV	9
1.7. Arbeitshypothesen und Ziel der Arbeit	10

2. Material und Methoden

2.1. Experimentelle Agenzien und Pharmaka	12
2.2. Versuchstiere	12
2.3. Geräte	13
2.4. Versuchsaufbau	13
2.5. Versuchsdurchführung	14
2.6. Weiterführende funktionelle Analysen	20
2.7. Langzeithypoxie	22
2.8. Kontrollexperimente	23
2.9. Ergebnisdarstellung und statistische Auswertung	23

3. Ergebnisse

3.1. Messung des pulmonalarteriellen Basisdrucks (<i>base PAP</i>)	25
3.2. Veränderungen am Mäuseherzen	26
3.3. Veränderungen der pulmonalen Vasokonstriktion unter hypoxischer Ventilation	29
3.4. Vasokonstriktion als Reaktion auf die Applikation von U-46619	30
3.5. Hemmung der Cyclooxygenasen und der NO-Synthasen	32

3.6. Zusammenfassende tabellarische Übersicht der Ergebnisse zur HPV unter akuter hypoxischer Ventilation und nach Hemmung der Cyclooxygenasen und der NO-Synthasen	36
3.7. Zusammenfassende tabellarische Übersicht der Ergebnisse zur Vasokonstriktion als Reaktion auf die Applikation von U-46619 und nach Hemmung der Cyclooxygenasen und der NO-Synthasen	37
4. <u>Diskussion</u>	38
5. <u>Zusammenfassung</u>	
5.1. In deutscher Sprache	48
5.2. In englischer Sprache	49
6. <u>Abkürzungsverzeichnis</u>	51
7. <u>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</u>	54
8. <u>Literaturverzeichnis</u>	56
9. <u>Publikationsverzeichnis</u>	66
10. <u>Ehrenwörtliche Erklärung</u>	67
11. <u>Danksagung</u>	68

1. Einleitung

1.1. Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV)

Der Mechanismus der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion (HPV) wurde in der heute bekannten Form erstmals 1946 durch von Euler und Liljestrand an der Katze beschrieben (1). Bereits 1852 hatte Beutner ebenfalls in Versuchen mit Katzen erkannt, dass die Unterbrechung einer manuellen Ventilation eine Erhöhung des pulmonalarteriellen Druckes zur Folge hat (2). Ähnliche Versuche wurden von Bradford und Dean 1892 an Hunden wiederholt; allerdings war man lange Zeit der Meinung, dass der beobachtete Druckanstieg durch einen Rückstau von Blut aus dem linken Vorhof zustande käme, also kardialer Genese sei (2). Der nach den (Wieder-) Entdeckern auch als von Euler-Liljestrand-Mechanismus bezeichnete Prozess ist bei allen bisher untersuchten Säugetierspezies nachweisbar (3). In Hochlandtieren beschrieben von Euler und Liljestrand schließlich, dass eine hypoxische Ventilation zwar zu einem Anstieg des pulmonalarteriellen, nicht aber des linksatrialen Druckes führt und dass der Druckanstieg durch die Hypoxie den bereits bekannten Druckanstieg durch moderate Anstrengung übertraf. Weiterhin zeigten sie, dass eine Vagotomie oder ein Ausschalten des Ganglion stellatum keinen Einfluss auf den Druckanstieg zeigte, es sich also um eine lokale, vom vegetativen Nervensystem unabhängige, Reaktion handelte (1, 2).

Der menschliche Organismus kann durch verschiedene Ursachen vorübergehender Hypoxie ausgesetzt sein. Dabei bezeichnet man die Reduktion der Sauerstofffraktion bei unverändertem Luftdruck als normobare Hypoxie. Bei Aufenthalt in großen Höhen liegt dagegen ein geringerer Druck vor, der, trotz unveränderter Gaskonzentration der Atmosphäre (hypobare Hypoxie), zu einer Senkung des Sauerstoffpartialdrucks in den Alveolen führt. Als weitere Beispiele sind intrauterine Entwicklungsstörungen, wie kongenitale intrakardiale Links-Rechts-Shunts oder diverse Erkrankungen, wie die umschriebene Systemsklerose oder die portale Hypertension, zu nennen (4). Unter physiologischen Bedingungen ist die HPV ein vasomotorischer Mechanismus, der die pulmonale Perfusion an den alveolären Sauerstoffpartialdruck anpasst und ermöglicht, durch eine Erhöhung des lokalen Gefäßwiderstands in schlecht ventilierten (hypoxischen) Lungenbezirken die Blutperfusion zu reduzieren; somit wird die Durchblutung in besser ventilierte Areale umgeleitet, was den Gasaustausch und die Oxygenierung des Blutes während der Lungenpassage optimiert (2). Dies ist notwendig, da die Effektivität des Gasaustausches (Abgabe von CO_2 aus dem und Aufnahme von O_2 in das Blut)

vom Konzentrationsgefälle der Gase zwischen dem Alveolarraum und dem Blutgefäß abhängt. Fließt Blut durch die nicht ventilierten Lungenareale, wird dies als sogenannte Shuntbildung bezeichnet. Um dies zu verhindern oder zumindest zu minimieren, ist es notwendig, die Perfusion an die Ventilation anzupassen.

Seit den Erstbeschreibungen der hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion ist diese Gegenstand zahlreicher klinischer und experimenteller Untersuchungen gewesen, deren Ergebnisse in vielfältigen Arbeiten zu diesem Thema publiziert wurden (2, 7-9). Dennoch ist die Regelschleife der Biochemie dieses Mechanismus, d.h. die Regelstrecke der Aktivierung und Deaktivierung der HPV, bis heute nicht im Detail bekannt. Die wesentlichen bisher diskutierten Signalwege zu denen publizierte experimentelle Daten vorliegen werden in den folgenden Abschnitten kurz vorgestellt. Das Verständnis des essentiellen Mechanismus der HPV ist deshalb von großem Interesse, weil sowohl eine Störung mit Verlust der HPV als auch eine Überaktivierung derselben zu schwerwiegenden, ebenfalls im Folgenden kurz erläuterten, klinischen Symptomen und Krankheitsbildern führen kann; zudem ist eine genaue Kenntnis der Regulationsvorgänge für spezifische therapeutische Interventionen unabdingbar. Auch auf diese pharmakologischen Möglichkeiten der Modulation der HPV wird im Folgenden noch näher eingegangen werden.

1.2. Physiologischer und pathophysiologischer Stellenwert der HPV

Die HPV findet im Wesentlichen in den präkapillären Widerstandsgefäßen der pulmonalen Strombahn statt. Hier stehen diese präkapillären Gefäße und die Alveolen, in denen sich die Atemluft befindet, in engster räumlicher Beziehung zueinander (10, 11). So ist es möglich, dass auf einen Abfall der alveolären Sauerstoffkonzentration unmittelbar mit einer lokalen Vasokonstriktion geantwortet werden kann, welche den Blutfluss in die, von den präkapillären Gefäßen versorgten, umliegenden Kapillaren verhindert (11).

Die HPV spielt bei zahlreichen Erkrankungen eine zentrale Rolle; hier sind beispielsweise Krankheitsbilder wie die Pneumonie, die Sepsis, das ARDS (*Acute Respiratory Distress Syndrome*) oder die Leberzirrhose zu nennen (13-16). Diesen Krankheitsbildern ist gemeinsam, dass es zu einem Ausfall oder einer Abschwächung der HPV kommen kann, woraus eine unzureichende Oxygenierung des Blutes während der Lungenpassage bis hin zu einem Shuntfluss resultieren kann. In extremer Ausprägung, z.B. beim ARDS, gefährdet dies die ausreichende Oxygenierung, selbst

wenn Patienten mechanisch optimal ventiliert sind (15). Oftmals liegt dem Ausfall der HPV in den genannten Fällen eine unkontrollierte Freisetzung von gefäßrelaxierenden Substanzen wie Stickstoffmonoxid oder Prostaglandinen einerseits und ein verändertes Ansprechen der glattmuskulären Gefäßwände auf diese Mediatoren andererseits zugrunde (13, 17). Die Möglichkeit einer HPV-spezifischen Intervention zur Senkung des Shuntvolumens ist daher bei diesen Krankheitsbildern von besonderem Interesse. Dem beschriebenen pathologischen Shuntfluss der Lunge stehen andererseits Krankheiten gegenüber, bei denen eine alveoläre Hypoxie infolge einer globalen pulmonalen Hypoventilation entsteht. Beim Asthma bronchiale, der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung und der zystischen Fibrose (Mukoviszidose) kommt es über unterschiedliche Pathomechanismen zu einer globalen oder lokalen Minderbelüftung; die hieraus resultierende HPV hat eine vermehrte Rechtsherzbelastung über eine Erhöhung des pulmonalarteriellen Gesamtwiderstands zur Folge. Diese führt auch zu Umbauvorgängen innerhalb der betroffenen Gefäßwände: Ein Prozess, der auch als „Remodeling“ bezeichnet wird und eine vermehrte Proliferation und Dickenzunahme der glatten Muskelzellen beschreibt (18). Die Manifestation dieses Zustandes wird auch als Lungenhochdruck oder pulmonale Hypertonie bezeichnet (19). Das infolge der Drucksteigerung im Lungenkreislauf belastete rechte Herz bezeichnet man als *Cor pulmonale*. Im Verlauf kann die durch die anhaltende Druckbelastung des rechten Ventrikels resultierende Hypertrophie in Verbindung mit einer abnehmenden Elastizität der Lungengefäße zu einem Pumpversagen der rechten Herzkammer führen (sogenannte Rechtsherzinsuffizienz) (20).

Das beschriebene Phänomen der globalen alveolären Hypoxie mit daraus resultierender Rechtsherzbelastung findet sich auch bei Säuge- und Nagetierspezies (einschließlich des Menschen), welche in großer Höhe bei dort niedrigem Sauerstoffpartialdruck leben. Darüber hinaus ist die Entwicklung des in großer Höhe auftretenden akuten Höhenlungenödems möglicherweise auf eine ungleichmäßig starke HPV in den verschiedenen Lungenbereichen zurückzuführen und weist pathophysiologische Gemeinsamkeiten mit dem ARDS auf (3, 21, 22).

1.3. Mechanismen und Mediatoren der akuten und der protrahierten hypoxischen Vasokonstriktion

Wie bereits beschrieben, ermöglicht die anatomische Lage von Alveolen und präkapillären Gefäßen eine Optimierung des Gasaustauschs in der Lunge durch eine Anpassung der Perfusion an die Ventilation. Diese wird auch als Ventilations-Perfusions-Matching (V/Q matching) bezeichnet (4). Unter alveolärer Hypoxie reagieren die präkapillären Lungengefäße der minderbelüfteten Lungenareale mit einer Erhöhung des Gefäßtonus; selbst bei pathologischer Atelektasenbildung ist damit durch die HPV weiterhin eine ausreichende Oxygenierung des Blutes während der Lungenpassage möglich (7). Der Auslöser für die Konstriktion der kleinen Pulmonalgefäße ist bereits eine Hypoxie, die Sauerstoffpartialdrücken von ca. 60mmHg entspricht (5, 6). Bezüglich des zeitlichen Verlaufs konnte in zahlreichen Untersuchungen an Tieren sowie am Menschen gezeigt werden, dass die HPV in zwei Phasen eingeteilt werden kann: Die erste Phase, die akute alveoläre Hypoxie, setzt bei alveolärer Hypoventilation innerhalb von Sekunden ein und erreicht nach 5-10 Minuten ein erstes Maximum. Sie fällt dann in ihrer Stärke wieder ab, um nach 20-30 Minuten wieder stärker zu werden; es folgt eine zweite plateauähnliche Phase, die protrahierte alveoläre Hypoxie. Diese scheint sich zwischen den Spezies zu unterscheiden: während der zweite Anstieg bei Hunden in den darauffolgenden Stunden wieder abfällt, bleibt er bei Schweinen konstant und steigt beim Menschen sogar auf eine weitere, mehrstündige und höhere Plateauphase (2). Bereits nach 2 Stunden kommt es dann zu einer „Fixierung“ der pulmonalvaskulären Widerstandserhöhung, die durch Sauerstoff nicht mehr akut antagonisierbar ist. Sie bildet möglicherweise die Überleitung in die Phase der chronischen Hypoxie, die letztlich zur pulmonalen Hypertonie und dem damit verbundenem Gefäßumbau führt (siehe auch 1.4. und 23).

Es konnte nachgewiesen werden, dass die pulmonalarteriellen glatten Muskelzellen (PASMC) sowohl Messfühler- als auch Regulationszellen der akuten hypoxischen Vasokonstriktion sind (11, 23). Es besteht Einigkeit darüber, dass die Stimulation über mehrere Signalwege zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels und damit zur Vaskonstriktion führt (6, 24, 25).

Diese Erhöhung des Kalziumspiegels kann zum einen nach vorangegangener Depolarisation der Zellmembran transmembranär über Kalziumkanäle, sogenannte spannungsbahängige L-Typ Kalziumkanäle (VOCE), oder über sogenannte „store-operated calcium channels“ (SOCE) durch einen Einstrom aus intrazellulären Kalziumspeichern erfolgen (26, 2). Es ist inzwischen weithin akzeptiert, dass die

Hypoxie auch eine Hemmung spannungsabhängiger Kaliumkanäle induziert, was wiederum eine Depolarisation der Zellmembran zur Folge hat und den Einstrom von Kalzium begünstigt. Eine besondere Bedeutung kommt dabei wohl den K_v Kanälen zu (27). Beteiligt an der akuten hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion sind neben den Kalzium- und Kaliumkanälen weitere Kanäle, sogenannte nicht selektive Ionenkanäle (28). Mehrere Untersuchungen belegen, dass aber nicht diese Kanäle selbst als direkte Sauerstoffsensoren agieren, sondern ihre Steuerung vielmehr durch einen speziellen pulmonalen Sauerstoffmechanismus bedingt wird. Diskutiert werden als initiale Sauerstoffsensoren Faktoren der mitochondrialen Atmungskette und mehrere Enzymsysteme, vor allem NAD(P)H-Oxidasen, Cythochrom P450 Enzyme und Hämoxygenase-2, die über eine vermehrte Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und konsekutiver Veränderung der Superoxid- und Wasserstoffperoxid-Bildung die Vasokonstriktion vermitteln. Für den Signaltransduktionsweg über reaktive Sauerstoffspezies (ROS) ist deren Interaktion mit Stickstoffmonoxid (NO) zur Hemmung bzw. Stimulierung weiterer Enzymsysteme (Guanylatcyclase) interessant (siehe 1.5.). Neu ist, dass sowohl die akute, als auch die protrahierte hypoxische Vasokonstriktion offenbar durch einen gleichartigen Sauerstoffsensor und primären Mediatorweg gesteuert werden (29).

1.4. Chronische Hypoxie

Unter chronisch hypoxischen Bedingungen kommt es über eine anhaltende generalisierte Vasokonstriktion zu einer dauerhaften Erhöhung des pulmonalarteriellen Gefäßwiderstandes, der pulmonalen Hypertonie. Dabei kommt es zu einer quantitativen und qualitativen Umstrukturierung innerhalb aller Schichten der betroffenen Gefäßwände: Ein Prozess, der auch als „Remodeling“ bezeichnet wird. Im Bereich der Gefäßmedia kommt es zu einer vermehrten Proliferation der glatten Muskelzellen (Hypertrophie der Media) und zu einer Dickenzunahme durch Migration von Fibroblasten aus der Lamina adventitia (Intimafibrose) (18). Zudem tritt eine *de-novo*-Muskularisierung von unter normoxischen Bedingungen nicht muskularisierten, präkapillären Arteriolen auf (30). Diese Umbauvorgänge führen zu einer zunehmenden Verringerung des Gefäßquerschnittes, einer Abnahme der Gefäßelastizität und auch zu Gefäßverlust (Rarefikation) und damit zu einer strukturellen Fixierung der Widerstandserhöhung in der Lunge, was in der Folge zu einem dauerhaften Druckanstieg im Lungenkreislauf führt. Das daraus resultierende Krankheitsbild ist die pulmonale Hypertonie mit konsekutiver Rechtsherzhypertrophie und Reduktion des

Herz-Zeit-Volumens (*Cor pulmonale*). Maßgeblich für den Gefäßumbauprozess im Zuge einer hypoxieinduzierten pulmonalen Hypertonie sind neben proinflammatorischen Zytokinen verschiedene Wachstumsfaktoren und vasoaktive Substanzen wie NO und NO-Synthasen (Abschnitt 1.5.), VEGF, Erythropoetin, Endothelin-1, Hämoxygenase, Thromboxan und Serotonin, die zum Teil vom gleichen Transkriptionsfaktor (HIF-1) gesteuert werden (31). Sie beeinflussen den Vasotonus und das Zellwachstum. Während vasodilatative und vasokonstriktive Mediatoren unter physiologischen Bedingungen in einem kontinuierlichen Gleichgewicht stehen, wird die Bildung und/oder Freisetzung der vasokonstriktiven Mediatoren unter Einfluss von chronischer Hypoxie verstärkt (32).

1.5. Die Rolle der Stickstoffmonoxid-Synthasen bei der HPV

Neben den genannten Mechanismen konnte bereits gezeigt werden, dass auch Stickstoffmonoxid (NO) an der Regulation der HPV beteiligt ist (33, 34). Als potenter Vasodilatator wird es kontinuierlich durch pulmonale Endothelzellen generiert und sowohl in das vaskuläre, wie auch in das alveoläre Kompartiment freigesetzt (35). NO selbst wird zum einen aus der Guanidingruppe von L-Arginin durch das Enzym Stickstoffmonoxid-Synthase synthetisiert, wofür die Anwesenheit von Sauerstoff als Substrat notwendig ist (36). Ein zusätzlicher möglicher Weg zur sauerstoffunabhängigen Entstehung von NO, der erst in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der Wissenschaft geriet, ist der Nitrat-Nitrit-NO-Pathway (37). Dieser ist noch unzureichend geklärt, allerdings sind die ersten Schritte der zugrundeliegenden Konversion von Nitrat zu Nitrit, insbesondere an der Magenschleimhaut, gut verstanden. Mit der Nahrung aufgenommenes Nitrat, z.B. aus Spinat, wird durch bakterielle Nitratreduktasen zu Nitrit reduziert, welches dann im Magen zu NO reagiert und hierdurch lokal die Schleimhautdurchblutung und damit die mukosale Integrität und Immunabwehr reguliert (38, 39). Ein Teil dieses NO wird jedoch auch über das Blut aufgenommen und gelangt damit systemisch, und dann auch im Bereich der HPV, zur Wirkung (37).

In der Lunge scheint jedoch die endotheliale NO-Synthese über NO-Synthasen (NOS) die wesentliche Rolle zu spielen.

Es wurden 3 Isoformen der NO-Synthase (NOS) beschrieben: eine neuronale (nNOS / NOS I), eine induzierbare (iNOS / NOS II) sowie eine endotheliale Form (eNOS / NOS

III) (48). Physiologisch ist die eNOS für die Vasoregulation die bedeutendste Isoform, sie kommt im Endothel vor und ihre Regulation unterliegt teilweise einer Induktion durch Wachstumsfaktorrezeptoren (VEGFR, PAFR) und luminalem Scherstress (49, 50). Über die Synthese von Stickstoffmonoxid, das durch Stimulierung der löslichen Guanylatcyclase in der glatten Gefäßmuskulatur die cGMP-Bildung fördert und somit zu einer Gefäßrelaxation führt, ist eNOS an der Regulation des normalen Pulmonalgefäßtonus beteiligt (50). Darüber hinaus wirkt NO proliferationshemmend auf die glatten Muskelzellen, während luminal abgegebenes NO die Plättchenaggregation und Leukozytenadhäsion hemmt (50). Eine Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in den Endothelien, wie sie z.B. bei Dyslipidämien und bei Rauchern vorkommt, kann durch die Reaktion von NO mit ROS zur Entstehung von zytotoxischem Peroxynitrit führen, welches für die Endothelzelle toxisch ist und zu deren gestörter Funktion (endotheliale Dysfunktion) sowie zum Zelltod führen kann (51).

Die Rolle von eNOS bei der Entstehung einer chronischen pulmonalen Hypertonie wird weiterhin kontrovers diskutiert. In einer Untersuchung von Giaid et al. (1995) ist an Pulmonalgefäßen von Patienten mit chronischer pulmonaler Hypertonie eine verringerte eNOS-Expression nachzuweisen (46). Im Gegensatz hierzu fanden Xue et al. (1995) eine gesteigerte pulmonalvaskuläre NOS-Expression auf mRNA- und Proteinebene bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie sowie unter Experimentalbedingungen bei Ratten unter alveolärer Hypoxie (52, 53). Es konnte zudem gezeigt werden, dass eine Überexpression der konstitutiven endothelialen NO-Synthase unter Nutzung eines adenoviralen Vektors (AdCMVceNOS) in Rattenlungen zu einer signifikanten Reduktion des hypoxieinduzierten pulmonalarteriellen Drucks (PAP) führt (40). Im Gegensatz hierzu führte ein gezieltes Ausschalten der endothelialen NO-Synthase bei Mäusen zu einer ausgeprägten pulmonalen Vasokonstriktion und Hypertonie (41). Ein ähnliches Bild zeigen Mäuse mit einem kongenitalen Defekt dieses Enzyms (42). Dieser Effekt ist auch therapeutisch von Interesse, da die bereits eingangs beschriebene unkontrollierte Vasodilatation durch systemische Freisetzung von Entzündungsmediatoren im Rahmen der Sepsis durch Applikation des NOS-Inhibitors N^G-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) im Schafmodell gehemmt und die HPV teilweise wiederhergestellt werden konnte (13).

Im Rahmen der akuten hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion führt eine Hypoxie durch Entzug des Substrates Sauerstoff zur Abnahme der NO-Synthese; bei der Entstehung der (chronischen) pulmonalen Hypertonie liegen dagegen eventuell andere Mechanismen zugrunde (43). Diskutiert wird hier unter anderem, neben dem bereits beschriebenen „Remodeling“ der Gefäßwände durch die Aktivierung

proliferationsfördernder Transkriptionsfaktoren, eine Repression der Transkription und Translation von eNOS (44). Die Expression der NO-Synthase in den Lungenendothelien auf Protein- und mRNA-Ebene scheint mit der Proliferation der Endothelzellen zu korrelieren und bei Patienten mit chronischem Lungenhochdruck abzunehmen, was deren Krankheitsbild zusätzlich verschärft (45, 46). Bei gesunden Menschen ist die NO-Synthase in den Lungenendothelien dagegen deutlich exprimiert und scheint hier durch eine konstante Freisetzung von NO den basalen Gefäßtonus der pulmonalarteriellen Äste zu regulieren (46, 47).

Auch die anderen Isoformen der NOS, iNOS und nNOS, werden in der Lunge exprimiert (54). iNOS findet sich sowohl im Atemwegsepithel, wie auch in der glatten Gefäß- und Atemmuskulatur und zeigt unter hypoxischen Bedingungen eine gesteigerte Expression (55). Sie ist allerdings nicht nur induzierbar im Rahmen einer Hypoxie, sondern auch unter physiologischen Bedingungen, hauptsächlich im Rahmen der unspezifischen Immunabwehr in Makrophagen, exprimiert und durch ihre Bindung an Calmodulin daueraktiv. Dabei synthetisiert die iNOS hohe NO-Mengen. Diese wirken dann direkt zytotoxisch (56-60).

Hiermit übereinstimmend konnte gezeigt werden, dass in Mäusen mit einem kompletten Knockout der endothelialen NOS auf Genebene (eNOS^{-/-}) der Ausfall der pulmonalen NO-Synthese durch eine Heraufregulation der iNOS kompensiert wird; ein Knockdown der iNOS bei erhaltener Expression der eNOS hatte hingegen keinen Effekt auf die HPV im Mausmodell (54, 61).

Die Isoform nNOS wird hingegen in nonadrenergen, noncholinergen Nervenendigungen der Lunge sowie im Bronchialepithel exprimiert und trägt zur Bildung von Stickstoffmonoxid in den unteren Atemwegen bei; hierbei scheint es insbesondere zur Regulierung des systemischen Gefäßtonus beizutragen (54, 62). Ein Knockdown des Enzyms scheint jedoch die HPV nicht maßgeblich zu beeinflussen (54).

1.6. Möglichkeiten der pharmakologischen Modulation der HPV

Da NO nicht nur in experimentellen Systemen, sondern auch alveolär freigesetzt wird, kann die Menge des synthetisierten NO annäherungsweise in der Ausatemluft bestimmt werden. Hierbei ist die Menge des exhalativ freigesetzten NO nicht konstant, sondern wird, übereinstimmend mit den bereits geschilderten experimentellen Daten, sauerstoffabhängig moduliert (36). Eine alveoläre Hypoxie provoziert hierbei in einer isolierten, artifizuell volumenflusskonstant und blutfrei perfundierten sowie ventilierten Kaninchenlunge einen raschen Abfall der exhalativen NO Konzentration, welcher dem pulmonalem Druckanstieg vorausgeht (63). Wird ein solcher Druckanstieg jedoch pharmakologisch durch Zugabe von Angiotensin II oder dem ebenfalls vasokonstriktorisches wirkenden U-46619 (einem synthetischen Thromboxanmimetikum) erzeugt, ist kein Abfall der exhalativen NO-Konzentration zu verzeichnen (63). Dies bestätigt den wesentlichen Stellenwert der durch die NOS vermittelten NO-Produktion in der Entstehung der HPV.

Der Abfall der NO-Konzentration ist reversibel. Nach Beendigung der Hypoxie erreicht sie nahezu ebenso schnell ihr prähypoxisches Niveau, wie sie es verlassen hat; dem NO-Konzentrationsanstieg folgt dann eine posthypoxische Gefäßrelaxation. Eine Inhibition der NO-Produktion, beispielsweise durch L-NMMA, verstärkt die HPV im Vergleich zu anderen vasokonstriktorisches Stimuli selektiv (47). Eine pharmakologische Ausschaltung dieses potenten Vasodilatators unter normoxischer Beatmung führt hingegen nicht zu einem nennenswerten Anstieg des pulmonalvaskulären Widerstandes, imitiert eine HPV also nicht (64). Eine ähnlich duale und im Detail wenig verstandene Rolle spielen Inhibitoren der unterschiedlichen Isoformen der Cyclooxygenase (COX), eines Schlüsselenzyms der Prostaglandinsynthese. Während das COX1-Syntheseprodukt Thromboxan A₂ über den Thromboxanrezeptor als potenter Vasokonstriktor wirkt und die HPV verstärkt (was durch Applikation des Thromboxananalogons U-46619 simuliert werden kann), gibt es auch Arbeiten, welche eine Verstärkung der HPV nach Applikation von COX-Inhibitoren beschreiben (66-69). Dieser Effekt ist am ehesten dem vasodilatatorischen Effekt der durch die COX2 synthetisierten Prostacycline zuzuschreiben. Einige Autoren vertreten aufgrund der dualen und partiell antagonistischen Wirkweise sogar die Ansicht, dass den Prostaglandinen insgesamt betrachtet bei der Autoregulation des pulmonalen Gefäßtonus unter Normoxie bzw. Hypoxie keine entscheidende Rolle zukommt (69).

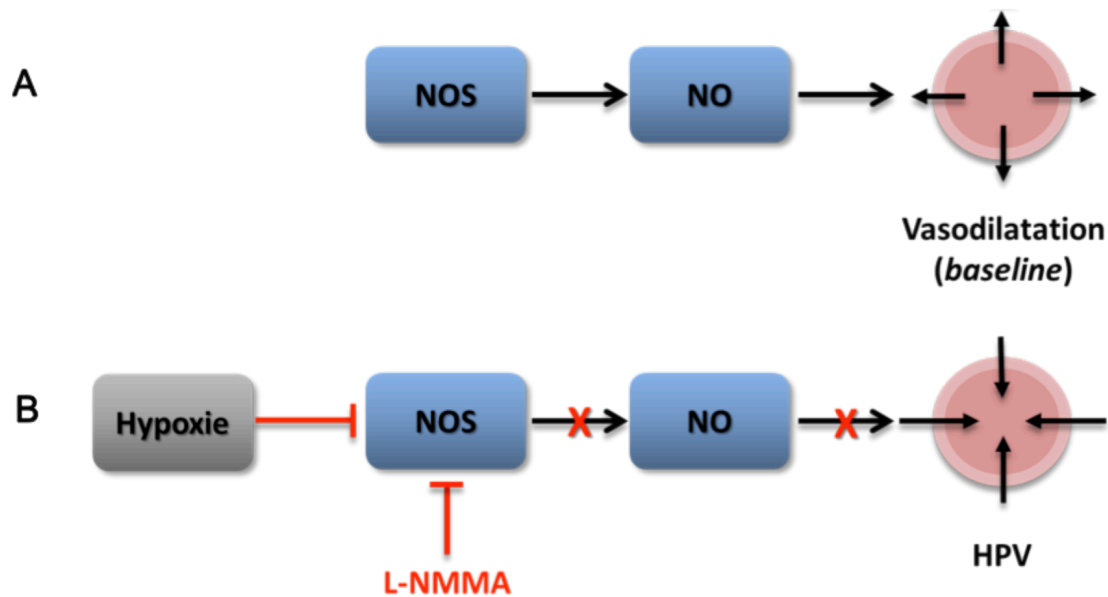


Abb. 1: Schemadarstellung der Regulation des Gefäßtonus durch NO.

A, im Normalzustand („baseline“) führt die konstante Freisetzung von NO durch die NOS zu einem entspannten Gefäßtonus.

B, eine alveoläre Hypoxie entzieht der NO-Synthase ihr Substrat, was die NO-Synthese hemmt und zur HPV führt. Dies kann experimentell auch durch Applikation eines Pseudosubstrates wie L-NMMA induziert werden.

NO(S), Stickstoffmonoxid(synthase); *U-46619*, synthetisches Thromboxananalogon; *L-NMMA*, *N*^G-Monomethyl-L-Arginin; *HPV*, hypoxische pulmonale Vasokonstriktion.

1.7. Arbeitshypothesen und Ziel der Arbeit

Die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) spielt im Rahmen der Autoregulation des pulmonalen Blutflusses durch die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV) eine zentrale Rolle; ein Ausfall des Enzyms kann nach publizierten Daten anderer Arbeitsgruppen zumindest teilweise durch eine Hochregulation der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) kompensiert werden. Die exakten Regulationsmechanismen der NO-Synthese bei der Autoregulation des Gefäßtonus sind jedoch trotz intensiver wissenschaftlicher Untersuchungen noch nicht im Detail verstanden.

In der vorliegenden Arbeit sollen daher folgende Hypothesen überprüft werden:

1. Ein eNOS bzw. iNOS-Knockout im Mausmodell führt bei 21 Tage unter Hypoxiebedingungen gehaltenen Mäusen zu einem veränderten pulmonalarteriellen Basisdruck sowie zu einem Remodeling insbesondere des rechten Herzens im Vergleich zu unter Normoxie gehaltenen Tieren.
2. Ein eNOS bzw. iNOS-Knockout im Mausmodell führt bei 21 Tage unter Hypoxiebedingungen gehaltenen Mäusen zu einer veränderten PV-Antwort auf hypoxische oder nicht-hypoxische Induktion im Vergleich zu unter Normoxie gehaltenen Tieren.
3. Eine Hemmung der NO-Synthasen (durch L-NMMA) sowie der COX (durch ASS) führt in Wildtypmäusen, nicht jedoch in eNOS bzw. iNOS-Knockouts, zu einer Verstärkung der hypoxischen und/oder hypoxieunabhängigen PV durch Ausschaltung vasodilatierender Mediatoren.

Die Ergebnisse sollen dazu beitragen, Regulationsmechanismen des pathophysiologisch und klinisch bedeutsamen Prozesses der HPV weiter aufzuklären und mögliche pharmakologische Angriffspunkte eingehender zu charakterisieren. Hierdurch könnte eine Verbesserung in Diagnostik und Behandlung von Patienten erzielt werden, welche beispielsweise akut respiratorische Dekompensationen im Rahmen einer Sepsis oder eines ARDS aufweisen oder an chronischen Lungenerkrankungen wie der COPD oder einer idiopathischen pulmonalen Hypertonie leiden.

2. Material und Methoden

2.1. Tabelle 1: Experimentelle Agenzien und Pharmaka

Name	Hersteller/ Zusammensetzung
Aspisol® (D,L-Lysin-mono-acetylsalicylat/ Glycin, 9:1, ASS)	Bayer AG (Leverkusen, DE)
Isotone Kochsalzlösung, 0,9% (NaCl)	Braun (Melsungen, DE)
L-NMMA (N ^G -Monomethyl-L-Arginin)	Calbiochem (Frankfurt, DE)
NaHCO ₃ (8,4%)	Merck (Darmstadt, DE)
U-46619 (9,11-dideoxy-9 α ,11 α -methanoepoxyprostaglandin F2 α)	Paesel und Lorei GmbH (Frankfurt/Main, DE)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck (Darmstadt, DE)
Krebs-Hensleit Puffer	Serag-Wiessner (Naila, DE)
Ethanol (C ₂ H ₅ OH), pro analysi	J. T. Baker Chemicals (Deventer, NL)
Liquemin® 25000: 5000I.E./ml (Na-Heparin)	Hoffman La Roche AG (Grenzach-Wyhlen, CH)
PBS (Phosphate buffered saline)	Bio-Whitacker/Serva (Heidelberg, DE)
Perfusatlösung	Serag-Wiessner (Naila, DE)
Zamboni's Fixatur	<ul style="list-style-type: none">• 390ml 0.2M Na₂HPO₄• 110ml 0.2M NaH₂PO₄• 25ml 16% PFA (Paraformaldehyd)• 15ml Saturated Picric Acid• 10ml Aqua dest.

Tierversuchsgenehmigung:

VI 63 – 19 c 20-15 c GI 20/10 und V 54 – 19 c 20-15 (1) GI 20/10 – Nr. 34/2006 und 22/2000.

2.2. Versuchstiere

Die in dieser Arbeit untersuchten transgenen Mäuse mit homozygotem Knockout von eNOS (eNOS^{-/-}) und iNOS (iNOS^{-/-}) waren mittels homologer Rekombination erzeugt und wurden kommerziell erworben (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, USA) (54, 70). Die alters- und stammgerecht zugeordneten Kontrollen (C57BL/6J über Charles River GmbH, Sulzfeld, Deutschland) wurden gemäß publizierter Methoden aus

den Wildtypstämmen der Elterngenerationen der Rassen C57BL/6J und SV129 gekreuzt (54). Die Mäuse wurden, soweit unter Experimentalbedingungen nicht anders angegeben, unter Standardbedingungen gehalten und mit Standardfutter und Wasser versorgt. Die Experimente wurden vom Regierungspräsidium Gießen mit der Nr. GI 20/10, 22/2000 genehmigt.

2.3. Geräte

- Doppelwandige Beatmungskammer IL-1 Typ 839 (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, DE) zur Präparation, Perfusion und Ventilation von Mäusen
- Meßverstärker, Plugsys DBA 660 (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, DE)
- Gasmischanlage, KM 60-3/6 MESO, Witt (Witten, DE)
- Druckaufnehmer Combitrans® Monitoring-Set, Braun (Melsungen, DE)
- Durchflußzytometer, Facstar Plus Cell Sorter (Argon-Ion-Laser, 5 W, betrieben bei 300 mW; Fa. Beckton-Dickinson, Mountain View, USA)
- Nahtmaterial, Mersilene 4,1 SH (Ethicon, Norderstedt, DE)
- Perfusionssystemschläuche, Tygon (Kalensee, Gießen, DE)
- Blutgasanalysegerät, ABL 330 (Radiometer Copenhagen, DK)
- Thermopumpe, Frigomix 1495, Thermomix 1480, Braun (Melsungen, DE)
- Zentrifuge RPC Rotanta, Hettich (Tuttlingen, DE)
- Peristaltikpumpe REGLO-Analogue MS-2/6-160 (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, DE)
- Beatmungspumpe HSE-Harvard MiniVent Ventilator 850 (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, DE)
- Sauerstoffsensor Proox 110 (Reming Bioinstruments Company, New York, USA)

2.4. Versuchsaufbau

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Modell der isolierten Mauslunge als blutfrei perfundiertes und artifiziell ventiliertes Versuchsorgan basiert auf dem Modell einer isolierten Kaninchenlunge, das 1912 von Knowlton und Starling beschrieben und in den darauffolgenden Jahrzehnten modifiziert und verfeinert wurde (71-73). Für die

Versuche in der vorliegenden Arbeit wurde der verwendete Lungenmessplatz der Firma Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten, DE), basierend auf dem für die Untersuchung der HPV an isolierten Kaninchenlungen entwickelten Modell von Grimmer et al. (63), modifiziert. Der Versuch bietet die Möglichkeit ein isoliertes, intaktes Organ unabhängig von zentralnervösen, metabolischen und humoralen Einflüssen des Gesamtorganismus zu untersuchen und biophysikalische Parameter (pulmonalerarterieller Druck, linksventrikulärer Druck) in Echtzeit zu dokumentieren. Weiterhin können aus dem zirkulierenden Perfusat problemlos Proben für biochemische Untersuchungen gewonnen werden. Die Charakterisierung des Perfusions-, Ventilations- und Messsystems sowie die Optimierung der Versuchsmodi erfolgte bereits in zahlreichen vorangegangenen sowie in Folgeuntersuchungen (63, 74-76).

Ein doppelwandiges Plexiglasgehäuse der Firma Hugo Sachs, March-Hugstetten, DE, diente als Grundaufbau zur Untersuchung von isolierten, perfundierten und ventilierten Mauslungen. In die Versuchskammer wurde das narkotisierte (Phenobarbital und 0,9% NaCl im Verhältnis 1:10 intraperitoneal mit 6µl pro Gramm Körpergewicht) und auf einer Korkplatte fixierte Versuchstier nach Einführen der Trachealkanüle gelegt und während der weiteren Präparationsphase mit Positivdruck beatmet. Durch einen konstanten, zirkulierenden Wasserstrom zwischen den Wänden der Lungenkammer und den Wänden des Reservoirs des Perfusionsmediums erfolgte eine Temperaturregulation. Die Zirkulation wurde durch eine Kühl-/Heizpumpe entgegen der Flussrichtung des die Lunge durchströmenden Perfusionsmediums angetrieben. Hierdurch konnte für die Präparation eine Abkühlung des Systems auf 4°C sowie für die Versuchsdauer eine Erwärmung auf 38°C ermöglicht werden. Um einen bronchoalveolären Reflux in die Trachealkanüle zu verhindern, war die Beatmungskammer in einem Neigungswinkel von 20° angebracht, wodurch die Trachea 1 cm oberhalb des Lungenniveaus zu liegen kam.

2.5. Versuchsdurchführung

2.5.1. Narkose und Antikoagulation

Mäuse verschiedenen Typs (Knockout-Mäuse und Kontrollen) sowie ausgeglichenen Geschlechterverhältnisses mit einem Alter von 3-6 Monaten und einem Körpergewicht zwischen 20g und 30g wurden mit einer Narkoselösung (Phenobarbital und 0,9% NaCl

im Verhältnis 1:10, intraperitoneal mit 6µl pro Gramm Körpergewicht) analgosediert. Die Antikoagulation erfolgte im sedierten Zustand über eine Injektion in die Schwanzvene mit 1000 I.E. Heparin pro kg/KG. Die Narkose bis zur Tötung wurde durch behördlich autorisierte Personen vorgenommen.

2.5.2. Intubation

Zur Beatmung der relaxierten und auf einer Korkplatte fixierten Maus wurde die Trachea durch Entfernen der Schilddrüse und des die Trachea umgebenden Muskelgewebes freipräpariert und nach Anlage eines Tracheostomas eine Trachealkanüle mit dem Durchmesser von 0,8mm eingeführt. Diese wurde mit einer äußeren Ligatur fixiert.

2.5.3. Integration der Maus in das Messsystem, Laparotomie und Thorakotomie

Die Maus wurde auf der Korkplatte in die auf 4°C gekühlte Apparatur gelegt und die eingebundene Trachealkanüle direkt mit dem Pneumotachometer verbunden. Die Beatmung erfolgte mit Überdruck und während der sich anschließenden Präparationsphase zunächst mit Raumluft bei einem Atemzugvolumen von 250-300 µl, einer Atemfrequenz von 90/min und einem positiven endexpiratorischen Druck (PEEP) von 2cm H₂O. Im Folgenden konnte die Haut durch senkrechte Schnitte über dem Sternum und waagerechte Schnitte entlang der Rippenbögen weiträumig mobilisiert werden. Über eine Inzision im Epigastrium erfolgte anschließend eine Oberbauchlaparotomie, die Anklammung des Processus xiphoideus und die breite Eröffnung des Abdomens entlang der Rippenbögen unter Schonung des Diaphragmas. Nach stumpfer Ablösung des Diaphragmas vom Sternum gelang die Eröffnung beider Pleurahöhlen. Hierbei wurde große Sorgfalt darauf verwendet, keine Lungenläsion zu setzen.

Der Thorax wurde nun durch einen medianen Schnitt durch das gesamte Sternum vollständig eröffnet, die Thoraxhälften aufgespreizt und lateral auf der Korkunterlage fixiert. Das Perikard wurde eröffnet und die Arteria pulmonalis unter dem Mikroskop mit einem Faden unterfahren. Ein Entlastungsschnitt erfolgte in die linke Ventrikelspitze.

Die pulmonalarterielle Kanüle wurde jetzt durch eine Inzision in den rechten Ventrikel eingeführt und unter Sicht in die Arteria pulmonalis vorgeschoben, wo sie mittels Ligatur fixiert wurde. Der Katheter war mit 4°C kaltem Perfusat blasenfrei vorgefüllt, wodurch Luftembolien der pulmonalen Strombahn weitgehend verhindert werden

konnten. Nun wurde die Beatmung auf das normoxische Gasgemisch mit 5,3% CO₂ umgestellt, um eine optimale pH-Wert-Einstellung nach vorangegangener kalter Perfusion der Lunge mit Bikarbonat-gepuffertem Perfusionsmedium zu erreichen. Ein Entlastungsschnitt im linken Ventrikel verhinderte den Aufbau eines Abflusshindernisses, das zur Erhöhung des pulmonalvaskulären Filtrationsdruckes mit konsekutivem Lungenödem geführt hätte.

Die venöse Kanüle wurde in den linken Ventrikel eingeführt und durch die hier kräftigere Ventrikelmuskulatur in Position gehalten.

Um den Unterkörper der Maus zu entfernen, wurden zunächst die Aorta abdominalis, dann die Vena cava und schließlich die Wirbelsäule in Höhe der Lendenwirbel durchtrennt. Über einen Zeitraum von etwa 20 Minuten und unter gleichzeitiger Registrierung der pulmonalarteriellen (PAP), linksventrikulären (LVP) und pleuralen (Ppleu) Drücke, konnten nun der Fluss des Perfusionsmediums auf 2 ml/min und die Temperatur des Perfusionsmediums auf 38°C gesteigert werden.

Der LVP wurde während der Temperatur- und Perfusionssteigerung mittels der linksvenösen Druckregulation auf 1,5 mmHg eingestellt und im Versuchsverlauf auf diesem Niveau konstant gehalten. Das in dieser Zeitspanne entstehende Perfusatvolumen von etwa 20ml wurde verworfen, d. h. das System in dieser Zeit nicht-rezirkulierend betrieben.

Einschlusskriterien zur Verwendung der Lungen im physiologischen Versuch waren eine homogene Oberfläche, die nach Ausspülen des Blutes weiß und ohne sichtbare Atelektasen imponierte.

2.5.4. Präparation des Mäuseherzens

Nach Abschluss der Versuchsmessungen wurden die mit Ligaturen befestigten Stahlkanülen aus der Arteria pulmonalis sowie dem linken Ventrikel entfernt. Das Herz wurde kranial der Atriumebene aus der Thoraxhöhle der Maus gelöst. Unter mikroskopischer Sicht wurden die Vorhöfe am Sinus coronarius von den Ventrikeln getrennt, sodass ein freier Blick auf die Klappenebene entstand. Der rechte Ventrikel wurde entlang des Sulcus interventricularis abgesetzt, sodass das Septum interventriculare als Teil des linken Ventrikels verblieb. Beide Ventrikel wurden auf vorher abgewogenen Objektträgern bei 37°C für 7 Tage in einem Trockenschrank getrocknet und nach der Trockenphase erneut gewogen.

2.5.6. Vorbereitung und Reinigung des Perfusionssystems

Das gesamte Perfusionssystem wurde vor jedem Versuch zunächst mit etwa 250ml destilliertem Wasser und im Anschluss daran mit etwa 30ml Perfusionsmedium nicht-rezirkulierend durchspült. Nach dem Reinigungs- und Füllungsvorgang wurden alle Luftblasen aus dem System entfernt. Unter auf 4°C laufender Kühlung rezirkulierte das blasenfreie System etwa 20 Minuten bis zum Versuchsbeginn am Ende der Tierpräparation. Nach jedem Experiment wurde zuerst das Perfusatresevoir-Gefäß durch Bürsten und mehrfaches Spülen gereinigt und anschließend das gesamte System bei 40°C mit 400ml *Aqua destillata* gespült. Am Ende wurde noch ein antimikrobielles Detergens zugegeben, das bis zur Spülung vor dem nächsten Versuch im System verblieb.

2.5.7. Perfusion

Mauslungen wurden initial nicht-rezirkulierend und dann, von Beginn des entsprechenden Versuchsmodus an, rezirkulierend mit einem konstanten Fluss von 2ml/min perfundiert. Das Perfusionsmedium wurde hierbei mit Hilfe einer Peristaltikpumpe aus dem Reservoir über einen Silikonschlauch zur pulmonalarteriellen Kanüle transportiert. Auf der Strecke passierte das Perfusat eine Schlauchspirale, die sich in dem zirkulierenden Wasserstrom der doppelwandigen Beatmungskammer beziehungsweise der Glasglocke befand. Hierdurch konnte auf die gewünschte Temperatur erwärmt bzw. abgekühlt werden. Dem Spiralsystem direkt nachgeschaltet befand sich eine erste Blasenfalle, welche von einer zweiten Blasenfalle direkt vor der Pulmonalarterienkanüle gefolgt wurde; dies verhinderte das Entstehen von Luftembolien.

Nach der Lungenpassage wurde das Perfusionsmedium im linken Herzventrikel von einer venösen Kanüle aufgenommen und nach Durchströmen eines Druckadjustiergefäßes über den an der Kanüle befestigten Silikonschlauch zum Reservoir zurückgeführt.

Beide Katheter (linksventrikulär bzw. rechtsventrikulär) bestanden aus Edelstahl und waren mit einem Gitter besetzt, welches das Kollabieren der Lungengefäße verhinderte. An beiden Kathetern befanden sich Kanülenzugänge, welche eine Gabe von pharmakologischen Substanzen im Bolus bzw. eine Entnahme von Proben des

Perfusionsmediums ermöglichten. Alternativ hierzu war eine Probenentnahme sowie die Gabe von Agenzien über das Reservoir möglich, wo ein Dreiwegehahn das Reservoir mit dem Pumpenschlauch verband.

Beide Katheter waren weiterhin über einen dünnen, mit Perfusionsmedium gefüllten, Schlauch (Innendurchmesser 0,5mm) mit mechanischen Drucksensoren verbunden. Veränderungen des Strömungswiderstandes durch Veränderung des Perfusionsflusses oder durch Vasokonstriktion und Vasodilatation im Lungengefäßbett konnten somit über die Registrierung des pulmonalarteriellen Druckes (PAP) gemessen werden. Nach dem identischen Prinzip wurde der Druck im linken Ventrikel (LVP) gemessen und konnte somit während des gesamten Versuchsablaufes auf einem konstanten Niveau von 1,5 mmHg gehalten werden.

Da Vasokonstriktionen im Lungengefäßbett den Gesamtquerschnitt der Lungengefäße verringern und somit den Strömungswiderstand erhöhen, kann dieses Geschehen an einem Anstieg des PAP erkannt werden, da die Lunge mit konstantem Volumenfluss perfundiert wurde. Im Falle einer Vasodilatation verhält es sich hingegen umgekehrt; der PAP fällt.

Die beschriebenen Drucksensoren wandelten das Drucksignal in ein elektrisches Signal um, welches mittels eines Messverstärkers sowie zeitgleich durch die Software Pulmodyn der Firma Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten, DE) in die elektronische Datenverarbeitung übertragen wurde.

Zur Perfusion wurde steriles synthetisches Perfusionsmedium mit folgender Zusammensetzung verwandt:

- Krebs-Henseleit Puffer (Serag-Wiessner, Naila, DE); Zusammensetzung: 120mM NaCl; 4,3mM KCl; 1,1mM KH_2PO_4 ; 4mM CaCl_2 ; 1,3mM MgCl_2 , 13,32mM Glukose;
- HAES Steril 5%

Das Perfusat wurde vor Versuchsbeginn durch Zugabe von NaHCO_3 sowie Instillation von CO_2 -Gas auf einen pH-Wert zwischen 7,25 und 7,27 eingestellt. Der pH-Wert wurde mittels eines Messgerätes (Radiometer ABL) im Verlauf des Versuchs mehrmals überprüft und gegebenenfalls angeglichen.

Nach der Präparation des Versuchstieres und Integration der Lunge in das Perfusionssystem erfolgte eine kontinuierliche Steigerung des Perfusionsflusses auf 2ml/min unter paralleler Registrierung des PAP, des LVP und des Beatmungsdruckes bei gleichzeitig erfolgender Temperaturerhöhung des gesamten Perfusionssystems auf

38°C. Die Steigerung von Perfusionsfluss und Temperatur wurde über einen Zeitraum von 20 min vorgenommen.

Das Perfusionssystem wurde bis zum Erreichen von maximalem Perfusatfluss und Endtemperatur nicht-rezirkulierend betrieben; das aus der Lunge austretende Perfusativolumen (ca. 20 ml) wurde verworfen.

Auf die Periode des Freispülens der Lungenstrombahn (v.a. von Blutresten) folgte eine Rezirkulationsphase bis zum Ende der gesamten Versuchsdauer mit Austausch des Perfusionsmediums nach vorgegebenem Versuchsplan.

2.5.8. Ventilation

Die künstliche Beatmung der Mauslunge erfolgte mit Überdruckbeatmung durch eine Kleintierbeatmungspumpe (HSE-Harvard MiniVent Ventilator 850, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, DE) nach Konnektion der in der Trachea eingebundenen Kanüle mit dem Pneumotachometer (positive pressure ventilation = PPV).

Das Atemzugvolumen betrug 300 µl, die Beatmungsfrequenz wurde auf 90 Atemzüge pro Minute eingestellt. Um ein Kollabieren der Alveolen zu verhindern, wurde mit einem positiven endexpiratorischen Druck (*positive endexpiratory pressure*, PEEP) von 3 cm Wassersäule gearbeitet.

In Abständen von 10 Minuten erreichte man durch jeweils kurzes Schließen des Expirationsschlauches einen tiefen Atemzug („Seufzer“= doppeltes Atemzugvolumen) mit Blähung der Lunge, was Atelektasen entgegenwirkte.

Die zugeführten Atemgase bestanden aus (Angaben in Volumen%, Gasmischanlage KM 60-3/6 MESO, Witt (Witten, DE):

- Raumlufte (GR);
- normoxischem Gasgemisch (21% O₂, 5,3% CO₂, Differenz zu 100%: N₂);
- hypoxischem Gasgemisch (3% O₂, 5,3% CO₂, Differenz zu 100%: N₂).

Der experimentelle Aufbau erlaubte ein direktes Umschalten zwischen den Gasgemischen, sodass innerhalb von wenigen Sekunden ein Wechsel zwischen den Gasen möglich war. Die kontinuierliche Gasversorgung der Beatmungspumpe erfolgte mit einem Gasfluss von 50 ml/min, der in einem Flowmeter gemessen wurde. Aus diesem zog die Beatmungspumpe über einen Versorgungsschlauch das erforderliche Atemzugvolumen von 300 µl.

2.6. Weiterführende funktionelle Analysen

2.6.1. Experimente mit hypoxisch sowie nicht-hypoxisch induzierten Vasokonstriktionen

Die Untersuchung der HPV an dem verwendeten Versuchsaufbau war, wie bereits erwähnt, durch die beschriebenen Modifikationen eines geeigneten experimentellen Modells von Grimminger et al. (63) möglich.

Auf die Perfusionssteigerungsphase, in der mit normoxischem Gas (21% O₂) beatmet wurde, folgte die ebenfalls normoxische Phase des *steady state* mit konstantem Perfusatfluss von 2ml/min sowie konstantem LVP von 1,5 +/- 0,1 mmHg und PAP für 10 Minuten.

Die Ventilation der Lungen wurde hiernach mit alternierend 10minütigen hypoxischen (3% O₂) und 15minütigen normoxischen (21% O₂) Beatmungen fortgeführt. Unter diesem Beatmungsmodus zeigten die Lungen sehr gut reproduzierbare, hypoxische Vasokonstriktionen über einen Zeitraum von bis zu 4 Stunden.

In weiteren Experimenten wurde eine vergleichbare Vasokonstriktion durch den Einsatz des synthetischen Thromboxanmimetikums U-46619 ausgelöst, um die Spezifität der Wirkungen des Pharmakons für den Sensor oder den daran gekoppelten Signaltransduktionsweg der HPV zu untersuchen. U-46619 wurde in einer resultierenden Konzentration von 1,5nM als Bolusapplikation mit definiertem konstantem Volumen von 50µl in einer 1ml-Spritze dem Perfusionskreislauf (Gesamtvolumen 22ml zirkulierendes Perfusat) zugeführt. Während dieser Experimente wurde durchgehend mit 21% O₂ ventiliert. Die Applikation erfolgte in einem den Hypoxieversuchen analogen Rhythmus von 25 Minuten und war somit mit dem sequentiellen norm- und hypoxischen Beatmungsmodus vergleichbar.

Die maximale Versuchslänge umfasste sechs hypoxische Vasokonstriktionen bzw. sieben U-46619-Druckstimuli. 3-6 gleichartige Versuche wurden zu jedem experimentellen Schema durchgeführt.

Die verwendete Lösung und ihre Konzentration:

- **U-46619** (9,11-dideoxy-9 α ,11 α -methanoepoxyprostaglandin F2 α , Paesel und Lorei GmbH, Frankfurt/Main, DE)
 - Molare Masse: 350,49 g/mol
 - Lösungsmittel: DMSO
 - Perfusionsmedium: Krebs-Hensleit Puffer (Serag-Wiessner, Naila, DE)
 - Appliziertes Volumen resultierend einer Konzentration von 1,5 nM

Die darauf aufbauende Untersuchung der biochemischen Regulation der HPV war auf der Grundlage des beschriebenen Versuchsschemas wiederholter Hypoxiephasen bzw. U-46619-Applikationen möglich. Die Experimente wurden dazu durch den Einsatz von Perfusionsmedien mit zugesetzten Agenzien modifiziert.

Die verwendeten pharmakologischen Agenzien und ihre Konzentrationen:

- **L-NMMA** (N^G-Monomethyl-L-Arginin; Calbiochem, Frankfurt, DE)
 - Molare Masse: 188,23 g/mol
 - Lösungsmittel: Perfusionsmedium
 - Perfusionsmedium: Krebs-Hensleit Puffer (Serag-Wiessner, Naila, DE)
 - Appliziertes Volumen resultierend einer Konzentration von 400 μ M
- **Aspisol®** (D,L-Lysin-mono-acetylsalicylat/ Glycin, 9:1, **ASS**; Bayer AG, Leverkusen, DE)
 - Molare Masse: 326,34 g/mol
 - Lösungsmittel: Aqua ad injectabilia
 - Perfusionsmedium: Krebs-Hensleit Puffer (Serag-Wiessner, Naila, DE)
 - Appliziertes Volumen resultierend einer Konzentration von 1 mM

Jeweils bis zum Ende der dritten Hypoxie-/Applikationsphase wurde das Perfusionssystem mit 5%iger HAES-Elektrolytlösung betrieben und erst danach ggf. modifiziert (siehe 2.6.2.).

Bei den Hypoxieversuchen wurde zu Beginn der nun folgenden vierten normoxischen Phase das Perfusat über den am Reservoirgefäß befindlichen Dreiwegehahn in einem Zeitraum von etwa 4 Minuten mehrfach gegen das agenshaltige Perfusionsmedium ausgetauscht, bis sich dieses vollständig im System verteilt hatte.

Entsprechend der für die hypoxische Vasokonstriktion beschriebenen Vorgehensweise wurde zudem der Einfluss der HPV-modulierenden Agenzien auf die U-46619-

induzierten pulmonalen Vasokonstriktionen untersucht. Auch hier wurde das Perfusionsmedium nach der dritten U-46619-induzierten Vasokonstriktion ausgetauscht.

2.6.2. Versuchsablauf im Rahmen weiterführender funktioneller Analysen

Die hypoxische bzw. pharmakologische Modulation der HPV wurde anhand vier verschiedener Versuchsprotokolle untersucht:

1. Sequentieller Wechsel zwischen 10 minütiger hypoxischer Ventilation und normoxischer Beatmungsphase von 15 Minuten Dauer (Hypoxieschema).
2. U-46619-Bolusapplikationen (analog Hypoxieschema) in Abständen von 25 Minuten. Normoxische Ventilation über die gesamte Versuchsdauer.
3. Perfusatwechsel nach der dritten Hypoxiephase bzw. U46619-Gabe ohne Veränderung der Zusammensetzung des Perfusionsmediums.
4. Perfusatwechsel nach der dritten Hypoxiephase bzw. der dritten U46619-Gabe unter Zugabe von L-NMMA und ASA zum Perfusionsmedium.

2.7. Langzeithypoxie

Die Versuchstiere, welche nach der Langzeithypoxie untersucht werden sollten, wurden 21 Tage vor Versuchsbeginn unter definierten Atemgasbedingungen gehalten:

- 10 % Vol./Vol.O₂,
- 0% CO₂,
- Differenz zu 100%: N₂.

Zur Reduktion des Sauerstoffgehaltes des Atemgases diente eine Gasmischanlage (Proox Model 100, Reming Bioinstruments Company), welche das in einem gegen Raumluft abgedichteten Käfigschrank zirkulierende Atemgas mit N₂ speiste. Die zirkulierende Atemluft wurde nach Verlassen des Käfigschrankes einem CO₂-Absorber

zugeführt, wodurch der CO₂ Anteil auf 0% Vol./Vol. reduziert werden konnte. Die Luftfeuchtigkeit des geschlossenen Systems konnte durch das Abkühlen der Atemluft auf 10°C in der Kühlfalle und Entfernen des Kondenswassers konstant gehalten werden.

Normoxische Kontrolltiere wurden unter gleichen Bedingungen wie die chronisch hypoxischen Tiere gehalten, nur unter normoxischer Atmosphäre.

2.8. Kontrollexperimente

Um entsprechende Schlussfolgerungen aus der Modifikation der pulmonalvaskulären Druckerhöhung unter Hypoxie oder durch eingesetzte Agenzien ziehen zu können, wurden Kontrollexperimente unter konstant normoxischer (21% O₂) Ventilation bzw. ohne Applikation der zu untersuchenden Substanz (nur mit deren Lösungsmittel) durchgeführt. Als Lösungsmittel wurde Perfusionsmedium oder Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet. DMSO wurde im Kontrollversuch zum gleichen Zeitpunkt und in gleicher Menge wie in korrespondierenden Versuchen mit Agenzieneinsatz appliziert. War die Substanz im Perfusionsmedium solubel, so wurde 5min vor dem Applikationszeitpunkt eine entsprechend Menge Perfusat dem rezirkulierenden System entnommen, und zum Applikationszeitpunkt mit gelöstem Agens wieder zugeführt.

2.9. Ergebnisdarstellung und statistische Auswertung

Die jeweiligen experimentellen Reihen werden unter Nennung der Anzahl der Einzelexperimente (n) und unter Angabe der entsprechenden Mittelwerte mit dazugehörigem Standardfehler (SEM) in Tabellen dargestellt. Die graphischen Darstellungen der Daten zeigen die pulmonalarteriellen Druckerhöhungen unter hypoxischer Vasokonstriktion (delta-PAP) als Mittelwert inkl. SEM.

Um Schwankungen in der interindividuellen Stärke der einzelnen Versuche zu normieren, wurde teilweise eine prozentuale Berechnung vorgenommen, die sich auf die 2. Hypoxiephase bezog. Dabei wurde der delta-PAP-Wert der 2. Hypoxie gleich 100% gesetzt und die delta-PAP-Werte der in dem Experiment folgenden Hypoxiephase in Prozent dieser 2. Hypoxiephase angegeben. Analog der Darstellung der Absolutwerte werden die so errechneten Werte nach erfolgter Mittelwertberechnung (+/- SEM) grafisch dargestellt.

Zusätzlich wird der größte und minimalste Anstieg des PAP unter Hypoxie angegeben. Derjenige PAP, der nach Anpassung des pulmonalen Gefäßsystems an die normoxische Ventilation gemessen wurde, wird als Basis-PAP bezeichnet und analog der Vorgehensweise für die Werte des delta-PAP ausgewertet und dargestellt. Als Basis-PAP gilt dabei jeweils der Wert direkt vor Beginn der einzelnen Hypoxiephasen bzw. der ersten Hypoxiephase. Sollte ein statistischer Vergleich der Mittelwerte aus nur zwei Versuchsreihen erfolgen, wurde der Student-t-Test verwendet (Mystat, Fa. Systat, Erkrath, DE). Erfolgte der Vergleich mehrerer experimenteller Reihen miteinander, wurde die statistische Überprüfung mittels Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Student-Newman-Keuls-Test als multiplem Vergleichstest durchgeführt (Mystat, Fa. Systat, Erkrath, DE). Das Signifikanzniveau wurde für alle statistischen Vergleiche bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p=0,05$ festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Messung des pulmonalarteriellen Basisdruckes (*base PAP*)

Zu Beginn jedes Experimentes im Modell der isolierten Mauslunge wurde der pulmonalarterielle Basisdruck (PAP), der analog zum pulmonalen Gefäßwiderstand ist, gemessen. Wie aus Abbildung 2 hervorgeht, lag der pulmonalarterielle Druck innerhalb der unter Raumluft (Normoxia) gehaltenen Gruppen (Kontrolltiere und transgene Versuchstiere) auf vergleichbarem Niveau. Dargestellt ist der Absolutwert des pulmonalarteriellen Basisdruckes in mmHg, welcher nach vollständigem Auswaschen des Blutes bei einer Perfusion von 2ml/min am Ende der steady-state-Phase gemessen wurde.

Eine Exposition gegenüber chronischer Hypoxie (21 Tage) verursachte, sowohl bei Wildtypmäusen wie auch in den iNOS- und eNOS-Knockout-Tieren, eine signifikante Steigerung des normoxischen pulmonalarteriellen Druckes (p-Wert für alle Gruppen im Vergleich zu Raumluftbedingungen $<0,001$), wobei innerhalb der Hypoxiegruppe kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolltieren und Knockout-Mäusen festzustellen war ($p>0,05$).

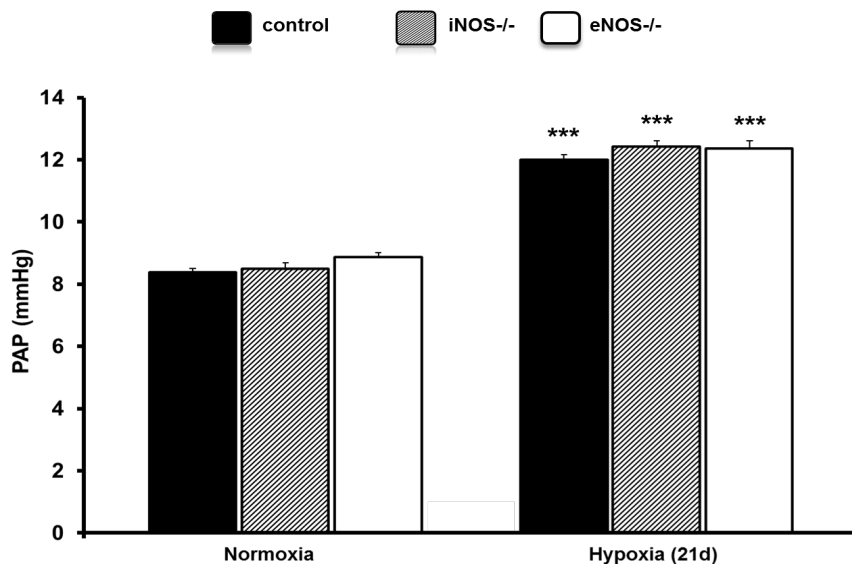


Abb. 2: Absoluter pulmonalarterieller Druck (PAP) gemessen in artifizell perfundierten Lungen nach Erreichen der Steady-State-Phase unter normoxischer Beatmung. Es zeigt sich ein signifikant höherer PAP in den unter Hypoxiebedingungen (Hypoxia 21d) gehaltenen Mäusen im Vergleich zu unter Raumluftbedingungen (Normoxia) gehaltenen Tieren. Mindestens n=12 Tiere pro Gruppe. PAP, pulmonalarterieller Druck; eNOS/iNOS $-/-$, Mäuse, defizient für die endotheliale bzw. induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase; Control = Wildtypmäuse (WT); ***, $p<0,001$ im Vergleich von Normoxie und Hypoxie.

3.2. Veränderungen am Mäuseherzen

Nach Beendigung jedes Versuches wurden unter mikroskopischer Sicht die Vorhöfe am Sinus coronarius von den Ventrikeln getrennt und die Ventrikel anschließend so präpariert, dass das Septum interventriculare als Anteil des linken Ventrikels und der rechte Ventrikel isoliert verblieben. Die Gewebeproben wurden anschließend wie unter 2.5.4. beschrieben aufgearbeitet und gewogen. Abbildung 3 stellt den Quotienten aus dem Gewicht des rechten Herzens geteilt durch das Gewicht des linken Herzens (inklusive des Kammerseptums) dar. Sowohl in transgenen iNOS- und eNOS-Mäusen als auch in der Wildtyp-Kontrollgruppe zeigte sich eine signifikante Steigerung des Quotienten nach Haltung unter hypoxischen Bedingungen für 21 Tage.

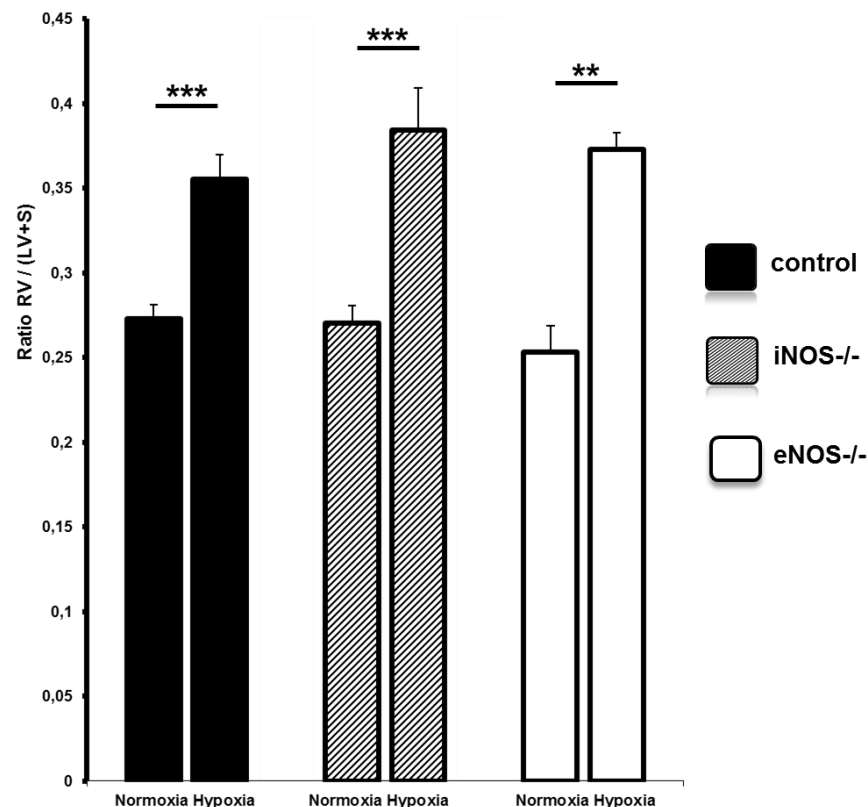


Abb. 3: Quotient der Gewichte aus rechtem Ventrikel / linkem Ventrikel mit Septum (Ratio RV / (LV+S)) in Wildtyp- (control), iNOS- und eNOS-Knockout-Mäusen unter norm- (21% O₂) und hypoxischen (21 Tage 10% Vol./Vol. O₂, 0% CO₂, Differenz zu 100%: N₂) Bedingungen (Normoxia / Hypoxia). Mindestens n=7 Tiere pro Gruppe. RV/LV, rechter/linker Ventrikel; S, Kammerseptum; eNOS/iNOS -/-, Mäuse, defizient für die endotheliale bzw. induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase; Control = Wildtypmäuse (WT); ***, p<0,001; **, p<0,01 im Vergleich von Normoxie und Hypoxie.

Einen Vergleich der Absolutgewichte von rechtem und linkem Ventrikel mit Septum in transgenen iNOS-Knockout-Mäusen und Wildtypen unter Normoxie und nach chronischer Hypoxie Exposition zeigt Abbildung 4. Es zeigt sich in beiden Gruppen ein erwartungsgemäß höheres Gewicht des linken Ventrikels mit Kammerseptum gegenüber dem rechten Ventrikel. Zwischen normoxischen und hypoxischen Gruppen zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied im Ventrikel-Absolutgewicht.

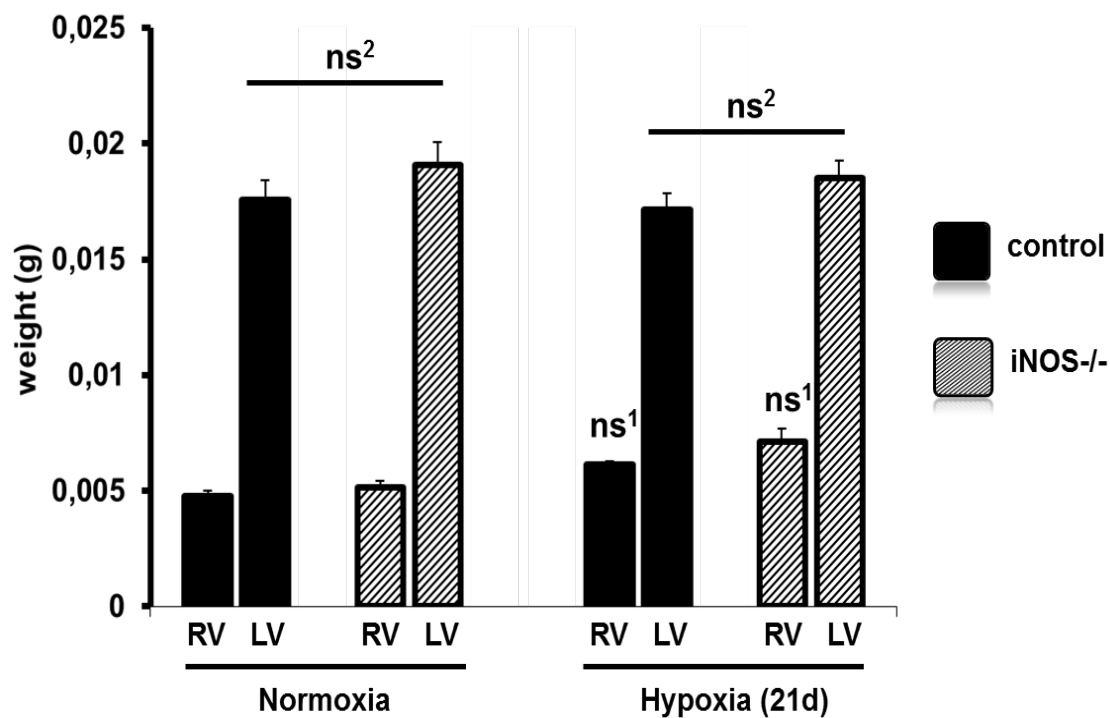


Abb. 4: Absolutgewichte (weight) des rechten Ventrikels (RV) und des linken Ventrikels mit Septum interventriculare (LV) in Wildtyp- (control) und iNOS-Knockout-Mäusen unter norm- (21% O₂) und hypoxischen (21 Tage 10% Vol./Vol. O₂, 0% CO₂, Differenz zu 100%: N₂) Bedingungen (Normoxia / Hypoxia). Mindestens n=7 Tiere pro Gruppe. RV/LV, rechter/linker Ventrikel; iNOS -/-, Mäuse, defizient für die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase; Control = Wildtypmäuse (WT); ns, nicht signifikant (p>0,05).

¹Hypoxie vs. Normoxie; ²Wildtypmäuse (control) vs. iNOS-Knockout-Mäuse.

Den Vergleich der Absolutgewichte von rechtem Ventrikel und linkem Ventrikel mit Septum in transgenen eNOS-Knockouts und Wildtypen unter norm- und hypoxischen Bedingungen zeigt Abbildung 5.

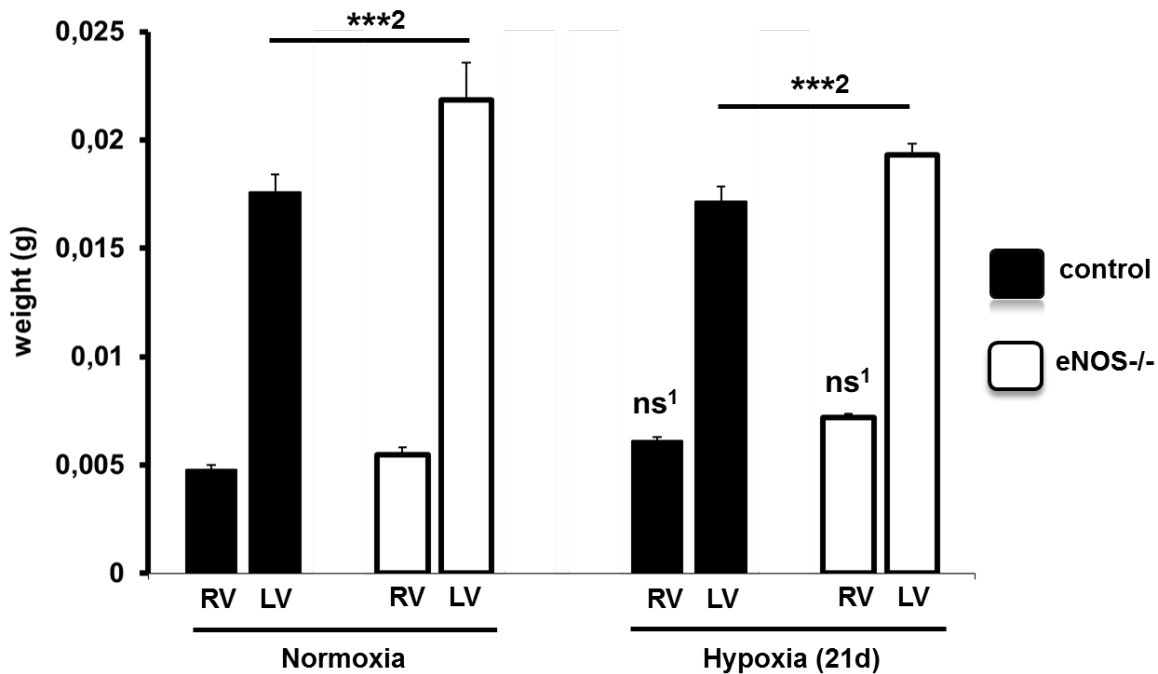


Abb. 5: Absolutgewichte (weight) des rechten Ventrikels (RV) und des linken Ventrikels mit Septum interventriculare (LV) in Wildtyp- (control) und eNOS-Knockout-Mäusen unter norm- (21% O₂) und hypoxischen (21 Tage 10% Vol./Vol. O₂, 0% CO₂, Differenz zu 100%: N₂) Bedingungen (Normoxia / Hypoxia). Mindestens n=7 Tiere pro Gruppe. RV/LV, rechter/linker Ventrikel; eNOS -/-, Mäuse, defizient für die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase; Control = Wildtypmäuse (WT); ns, nicht signifikant ($p > 0,05$); ***, $p < 0,001$; ¹Hypoxie vs. Normoxie; ²Wildtypmäuse (control) vs. eNOS-Knockout-Mäuse.

Nach chronischer Hypoxie (21 Tage/10% O₂) nimmt in beiden Gruppen (Wildtyp- und eNOS-Knockout-Mäuse) das Gewicht des rechten Ventrikels tendenziell, jedoch nicht signifikant, zu. Dagegen bleibt das Gewicht des linken Ventrikels mit Septum in Wildtypmäusen nach chronischer Hypoxie Exposition nahezu gleich, in transgenen eNOS Tieren nimmt es tendenziell sogar ab. Insgesamt ist das Gewicht des linken Ventrikels mit Septum in eNOS-Knockout-Mäusen jedoch, sowohl bei den unter normoxischen, als auch bei den unter chronisch hypoxischen Bedingungen gehaltenen Tieren, signifikant höher als das der Wildtypmäuse ($p < 0,001$).

Eine durch die chronische Hypoxie Exposition entstehende Hypertrophie des rechten Ventrikels, gemessen als Gewichtszunahme, konnte somit in transgenen iNOS- und eNOS- wie auch bei den Wildtypmäusen nachgewiesen werden.

3.3. Veränderungen der pulmonalen Vasokonstriktion unter hypoxischer Ventilation

Zur Messung der Veränderungen unter akuter hypoxischer Ventilation wurden die artifizell perfundierten Mäuselungen für 10 Minuten mit 3% O₂ beatmet. Dabei zeigte sich, wie bereits im Kapitel "Material und Methoden" näher erläutert, eine akute Vasokonstriktion in einem Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes. Dieser Versuchsablauf wurde auch als sogenannte „akute Hypoxie“ bezeichnet. Auf jede akute Hypoxiephase folgte für 15 Minuten die Ventilation mit 21% O₂.

Wie in Abbildung 6 gezeigt, betrug die Steigerung des PAP unter akuter Hypoxie bei den vor Versuchsbeginn unter normoxischen Bedingungen gehaltenen Wildtypen 1,9 +/- 0,3mmHg. Wurden die Wildtypen über 21 Tage hypoxisch (bei 10% O₂) gehalten, konnte eine signifikant ausgeprägtere hypoxische Vasokonstriktion gemessen werden; der PAP betrug in dieser Gruppe 5,2 +/- 0,9mmHg.

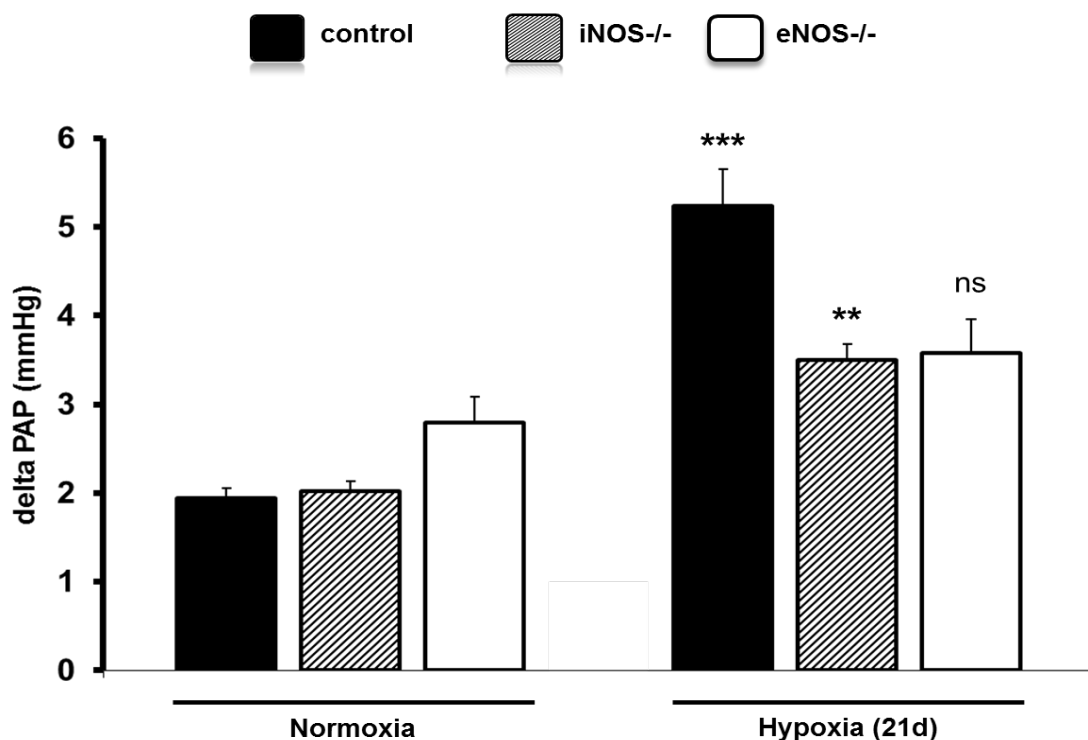


Abb. 6: Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion unter akuter hypoxischer Ventilation (10min 3% O₂) nach chronischer Hypoxie Exposition der Mäuse (21 Tage, 10 % O₂) im Vergleich zu normoxisch gehaltenen Mäusen. Dargestellt der maximale Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (delta PAP) als Absolutwert in mmHg unter akuter hypoxischer Ventilation mit 3% O₂ für 10 Minuten. Mindestens n=4 Tiere pro Gruppe. PAP, pulmonalarterieller Druck; eNOS/iNOS -/-, Mäuse, defizient für die endotheliale bzw. induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase; Control = Wildtypmäuse (WT); Signifikanzen für den Vergleich zwischen unter normoxischen Bedingungen (Normoxia) und unter chronischer Hypoxieexposition (Hypoxia 21d) gehaltenen Mäusen: ***, p<0,001; **, p<0,01; ns, nicht signifikant (p>0,05).

In den normoxisch gehaltenen transgenen iNOS-Knockouts lag die Stärke der HPV bei einem deltaPAP auf dem Niveau der Wildtypiere. Mit einem deltaPAP von $3,5 \pm 0,4$ mmHg war die hypoxische Vasokonstriktion nach Haltung unter 21 Tagen mit 10% O₂ innerhalb der iNOS-Gruppe signifikant höher, jedoch geringer ausgeprägt als in der Wildtyp-Kontrollgruppe.

Bei den transgenen eNOS-Mäusen kam es innerhalb der Gruppe zwischen norm- und hypoxisch gehaltenen Versuchstieren zu einem tendenziellen, aber nicht signifikanten, Anstieg des deltaPAP bei akuter hypoxischer Ventilation. Die HPV unter akuter Hypoxie war in den zuvor normoxisch gehaltenen eNOS-Knockouts mit einem deltaPAP von $2,8 \pm 0,75$ mmHg signifikant deutlicher ausgeprägt als in der iNOS-Vergleichsgruppe und als in den Wildtypen. In den chronisch hypoxischen eNOS-Knockouts war die hypoxische Vasokonstriktion unter akuter Hypoxie geringer ausgeprägt als in der Wildtyp-Kontrollgruppe, der PAP lag hier auf dem Niveau der iNOS-Vergleichsgruppe.

3.4. Vasokonstriktion als Reaktion auf die Applikation von U-46619

Die wiederholte Bolusapplikation des Thromboxananalogons U-46619, wie unter 2.6.1. beschrieben, führte zu einer nicht-hypoxieabhängigen pulmonalen Vasokonstriktion. Hierbei wurde das Agens in definiertem konstantem Volumen während des Experiments direkt dem Perfusatkreislauf zugeführt. Die Ventilation der artifziell perfundierten Lungen erfolgte in diesem Versuchsansatz für die gesamte Versuchsdauer durchgehend mit 21% O₂.

Die durch die Applikation von U-46619 entstandenen, nicht-hypoxieabhängigen, Vasokonstriktionen waren bei unter normoxischen Bedingungen gehaltenen eNOS-Knockout-Mäusen mit einem deltaPAP von $1,9 \pm 0,8$ mmHg signifikant stärker als in Wildtypmäusen bzw. iNOS-Knockouts mit einem deltaPAP von $1,2 \pm 0,1$ mmHg bzw. $1,3 \pm 0,2$ mmHg ($p < 0,05$; Abbildung 7).

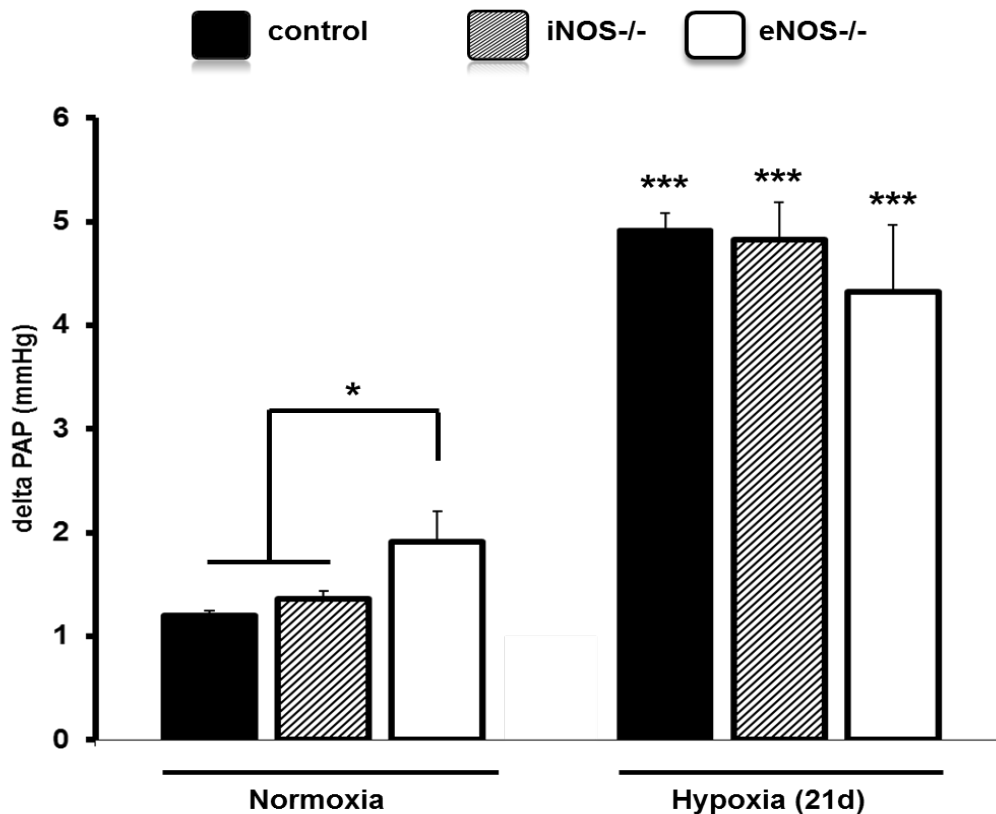


Abb. 7: Die Stärke der pulmonalen Vasokonstriktion nach Applikation des Thromboxanmimetikums U-46619. Dargestellt ist der maximale Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (delta PAP) als Absolutwert in mmHg durch Applikation von U-46619 in einer Konzentration von 1,5nM. Mindestens n=4 Tiere pro Gruppe. PAP, pulmonalarterieller Druck; eNOS/iNOS -/-, Mäuse, defizient für die endotheliale bzw. induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase; Control = Wildtypmäuse (WT); ***, $p < 0,001$; *, $p < 0,05$; ns, nicht signifikant ($p > 0,05$).

Weiterhin kam es sowohl in den transgenen iNOS- und eNOS-Knockout-Versuchstieren wie auch in den Wildtyp-Kontrolltieren zu einer signifikanten ($p < 0,001$) Vasokonstriktion bei Gabe des Thromboxanmimetikums nach chronischer Hypoxie Exposition der Versuchstiere über 21 Tage (Abb. 7). Diese nicht-hypoxieinduzierte Vasokonstriktion war in den transgenen iNOS- und eNOS-Tieren stärker ausgeprägt als die hypoxieinduzierte Vasokonstriktion durch akute hypoxische Ventilation (vgl. Abb. 6), obwohl die HPV in Tieren mit normoxischer Exposition eine höhere Vasokonstriktion hervorrief als die Applikation von U-46619.

3.5. Hemmung der Cyclooxygenasen und der NO-Synthasen

Um den Effekt der Hemmung der NO-Synthasen sowie der Cyclooxygenasen (COX) auf die pulmonale Vasokonstriktion zu untersuchen und so Einblick in die biochemischen Regel- bzw. Modulationswege der pulmonalen Vasokonstriktion zu erhalten, wurden im nächsten Schritt das NOS-Substratanalogon N^G-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA, 400µM) sowie D,L-Lysin-mono-acetylsalicylat (ASS, 1mM) zugegeben. Wie bei der Erläuterung der Versuchsmodi beschrieben, erfolgte die Applikation dieser Agenzien in der zweiten Versuchshälfte im Rahmen des Perfusatwechsels.

Abbildung 8 stellt dar, dass die Stärke der HPV unter akuter hypoxischer Ventilation zwischen allen unter normoxischen Bedingungen gehaltenen Tiergruppen (WT, iNOS-/- und eNOS-/-) nach Applikation der Hemmer des NO- bzw. Cyclooxygenase-Stoffwechsels keinen signifikanten Unterschied zeigt, anders als bei den Ergebnissen ohne COX-/NOS-Hemmung, wo die HPV unter akuter Hypoxie in den zuvor unter normoxischen Bedingungen gehaltenen eNOS-Knockouts signifikant deutlicher ausgeprägt war als in der iNOS-Gruppe und in den Wildtypen (Abb. 6).

Im Vergleich der Abbildungen 6 und 8 wird deutlich, dass der delta PAP bei akuter hypoxieinduzierter Vasokonstriktion in der Normoxie-Gruppe nach Hemmung der NO-Synthasen und der Cyclooxygenasen insgesamt aber höher war als ohne Zugabe von L-NMMA und ASS.

Bei den unter langanhaltenden Hypoxiebedingungen (21 Tage / 10 % O₂) gehaltenen Mäusen war die HPV nach Applikation der Hemmer des NO- bzw. Cyclooxygenase-Stoffwechsels in den Wildtypen signifikant stärker als in den beiden Knockout-Gruppen (iNOS-/- und eNOS-/-), die sich nicht signifikant voneinander unterschieden (Abb. 8). Dies konnte ebenso zuvor in den Experimenten ohne Zugabe von L-NMMA und ASS gezeigt werden (Abb. 6).

In der Gruppe der chronischen Hypoxietiere wurde die HPV in Wildtypen und iNOS-Mäusen nach Hemmung von NOS und COX verstärkt im Vergleich zum delta PAP bei akuter hypoxieinduzierter Vasokonstriktion ohne Zugabe von L-NMMA und ASS, wie die Abbildungen 6 und 8 zeigen. In der unter Hypoxiebedingungen gehaltenen eNOS-Gruppe kam es dagegen unter Zugabe von L-NMMA und ASS zu keinem pulmonalarteriellen Druckanstieg, das Niveau von ca. 3,6 +/- 0,4mmHg wird nahezu beibehalten.

Wie bereits ohne Zugabe von L-NMMA und ASS, stellte sich, wie in Abbildung 8 gezeigt, auch nach Perfusatwechsel mit L-NMMA und ASS bei den unter chronischen

hypoxischen Bedingungen gehaltenen Wildtypen im Vergleich zu den unter Normoxie gehaltenen Wildtypen ein signifikanter Anstieg der Stärke der HPV dar. Bei den iNOS-Knockout-Mäusen hingegen kam es zu keinem signifikanten Anstieg, in der eNOS-Gruppe schien der delta PAP bei akuter Hypoxie in den zuvor unter hypoxischen Bedingungen gehaltenen Mäusen sogar tendenziell geringer zu sein als in der Gruppe der unter Normoxie gehaltenen eNOS-Knockout-Mäuse, wobei dieser Unterschied nicht statistisch signifikant war.

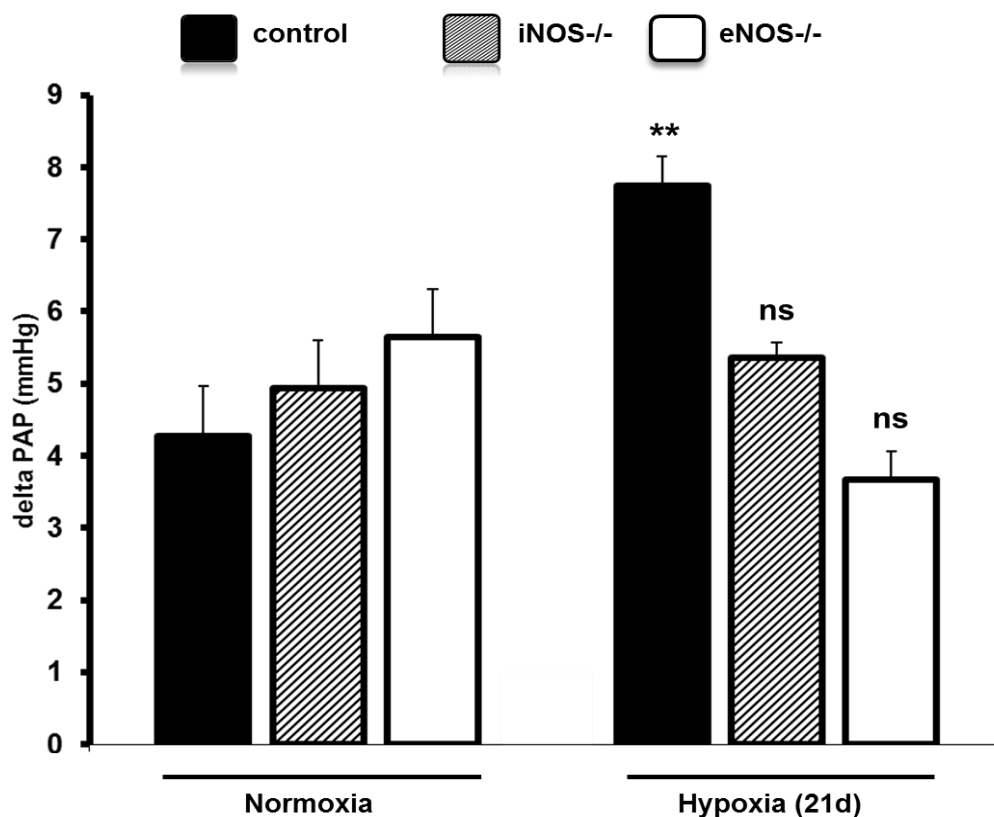


Abb. 8: Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion unter akuter hypoxischer Ventilation (10min 3% O₂) und Hemmung der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) durch N^G-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) sowie der Cyclooxygenasen (COX) durch D,L-Lysin-mono-acetylsalicylat (ASS). Dargestellt ist der maximale Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (delta PAP) als Absolutwert in mmHg induziert durch die akute hypoxische Ventilation mit 3% O₂ für 10 Minuten. Mindestens n=4 Tiere pro Gruppe. PAP, pulmonalarterieller Druck; eNOS/iNOS -/-, Mäuse, defizient für die endotheliale bzw. induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase; Control = Wildtypmäuse (WT); **, p<0,01; ns, nicht signifikant (p>0,05).

Abbildung 9 zeigt, dass durch U-46619 induzierte, nicht-hypoxieabhängige, Vasokonstriktionen nach Zugabe von L-NMMA und ASS in unter normoxischen Bedingungen gehaltenen Wildtypen und iNOS mit $2,4 \pm 1,2 \text{ mmHg}$ bzw. $2,3 \pm 0,4 \text{ mmHg}$ auf gleichem Niveau lagen und tendenziell, allerdings nicht signifikant, stärker ausgeprägt waren als in eNOS-Mäusen mit einem ΔPAP von $1 \pm 0,5 \text{ mmHg}$. Im Gegensatz dazu waren zuvor in den Experimenten ohne Zugabe der NO- und Cyclooxygenasehemmstoffe in den eNOS-Knockouts höhere Druckanstiege gemessen worden, die sogar signifikant über denen der Wildtypen und der transgenen iNOS-Mäuse lagen, wobei Wildtypmäuse und iNOS-Knockouts ebenfalls auf vergleichbarem Niveau lagen (Abb. 7).

Es war weiterhin zu beobachten, wie in Abbildung 9 dargestellt, dass es innerhalb jeder Gruppe unter Zugabe von L-NMMA und ASS, sowohl in den Knockout-Tieren (iNOS-/- und eNOS-/-) wie auch in den Wildtyp-Kontrolltieren, zu einer signifikant stärkeren Vasokonstriktion nach Gabe des Thromboxanmimetikums nach Exposition der Versuchstiere mit chronischer Hypoxie über 21 Tage im Vergleich zur Normoxie-Gruppe kam.

Diese Verstärkung des primär nicht-hypoxieinduzierten vasokonstriktorisches Effektes nach Exposition mit chronischer Hypoxie im Vergleich zu den unter normoxischen Bedingungen gehaltenen Mäusen innerhalb aller Versuchstiergruppen deckt sich mit den bereits in den Experimenten ohne Veränderung des Perfusats getätigten Beobachtungen (Abb. 7).

Im Gegensatz zu diesen Experimenten war jedoch, wie bereits erwähnt, nach Zugabe der NO-Synthase- und Cyclooxygenase-Hemmstoffe unter der akuten hypoxischen Ventilation keine signifikante Verstärkung der bei iNOS- und eNOS-Knockout-Mäusen zu beobachten (Abb. 8).

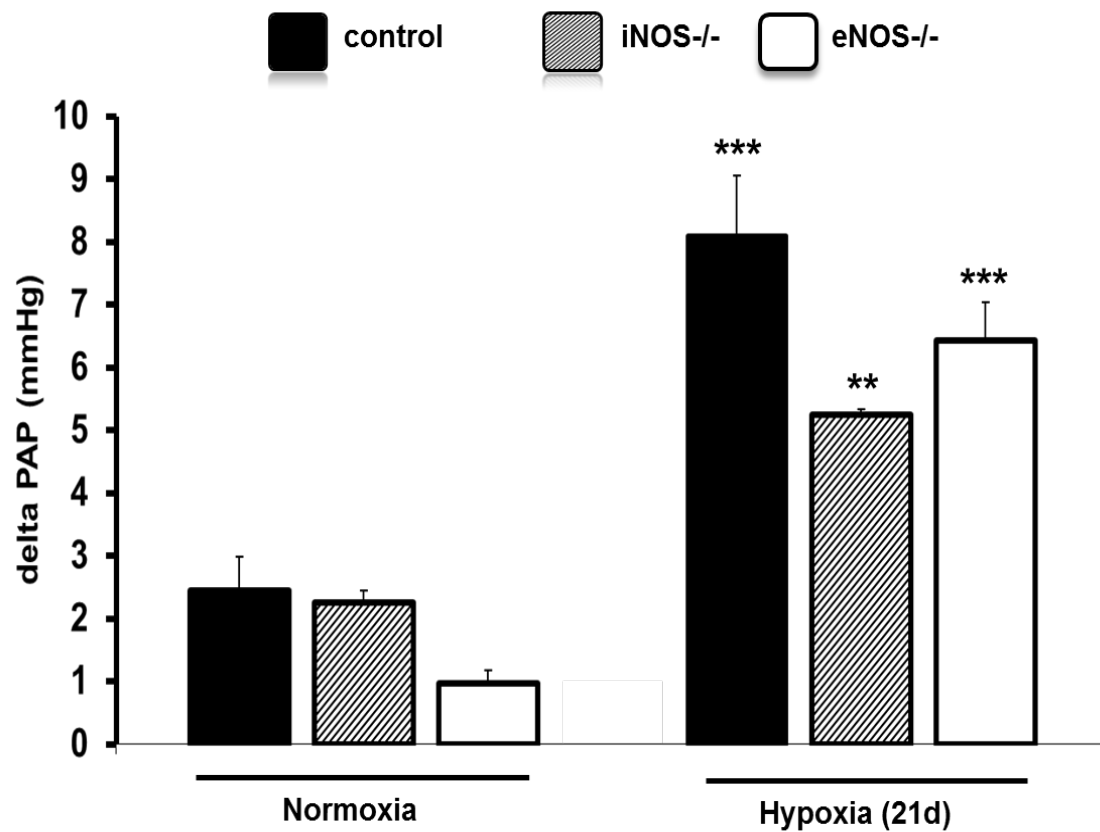


Abb. 9: Die Stärke der pulmonalen Vasokonstriktion nach Applikation des Thromboxanmimetikums U-46619 unter Hemmung der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) durch N^G-Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) sowie der Cyclooxygenasen (COX) durch D,L-Lysin-mono-acetylsalicylat (ASS). Dargestellt ist der maximale Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (delta PAP) als Absolutwert in mmHg durch Applikation von U-46619 in einer Konzentration von 1,5nM. Mindestens n=4 Tiere pro Gruppe. PAP, pulmonalarterieller Druck; eNOS/iNOS -/-, Mäuse, defizient für die endotheliale bzw. induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase; Control = Wildtypmäuse (WT); ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$.

3.6. Zusammenfassende tabellarische Übersicht der Ergebnisse zur HPV unter akuter hypoxischer Ventilation und nach Hemmung der Cyclooxygenasen und der NO-Synthasen (Abbildungen 6 und 8)

Tabelle 2: Vergleich der HPV-Stärke innerhalb einer Tiergruppe nach deren Haltung unter hypoxischen versus normoxischen Bedingungen in Experimenten ohne und mit (-/+) Zugabe von L-NMMA/ASS

	control (WT)	iNOS -/-	eNOS -/-
Hypoxia versus Normoxia – L-NMMA/ASS	↑↑↑	↑↑	-
Hypoxia versus Normoxia + L-NMMA/ASS	↑↑	-	- (↓)

Tabelle 3: Vergleich der HPV-Stärke zwischen den Tiergruppen nach deren Haltung unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen in Experimenten ohne und mit (-/+) Zugabe von L-NMMA/ASS

	Normoxia	Normoxia + LNMMA/ASS	Hypoxia	Hypoxia + LNMMA/ASS
iNOS -/- versus control (WT)	-	-	↓↓	↓
eNOS -/- versus control (WT)	↑↑	-	↓↓	↓↓↓
eNOS -/- versus iNOS -/-	↑↑	-	-	- (↓)

Zeichenerläuterung:

↑/↓	Zu-/Abnahme der HPV-Stärke
↑↑↑/↓↓↓	= *** (p < 0,001)
↑↑/↓↓	= ** (p < 0,01)
↑/↓	= * (p < 0,05)
-	= ns (p > 0,05)

3.7. Zusammenfassende tabellarische Übersicht der Ergebnisse zur Vasokonstriktion als Reaktion auf die Applikation von U-46619 und nach Hemmung der Cyclooxygenasen und der NO-Synthasen (Abbildungen 7 und 9)

Tabelle 4: Vergleich der Stärke der Vasokonstriktion nach U-46619 Gabe innerhalb einer Tiergruppe nach deren Haltung unter hypoxischen versus normoxischen Bedingungen in Experimenten ohne und mit (-/+) Zugabe von L-NMMA/ASS

	control (WT)	iNOS -/-	eNOS -/-
Hypoxia versus Normoxia – L-NMMA/ASS	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑
Hypoxia versus Normoxia + L-NMMA/ASS	↑↑↑	↑↑	↑↑↑

Tabelle 5: Vergleich der Stärke der Vasokonstriktion nach U-46619 Gabe zwischen den Tiergruppen nach deren Haltung unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen in Experimenten ohne und mit (-/+) Zugabe von L-NMMA/ASS

	Normoxia	Normoxia + LNMMA/ASS	Hypoxia	Hypoxia + LNMMA/ASS
iNOS -/- versus control (WT)	-	-	-	↓↓
eNOS -/- versus control (WT)	↑	- (↓)	-	↓
eNOS -/- versus iNOS -/-	↑	- (↓)	-	- (↑)

Zeichenerläuterung:

↑/↓	Zu-/Abnahme der Stärke der Vasokonstriktion nach U-46619 Gabe
↑↑↑/↓↓↓	= *** (p < 0,001)
↑↑/↓↓	= ** (p < 0,01)
↑/↓	= * (p < 0,05)
-	= ns (p > 0,05)

4. Diskussion

4.1. Veränderungen des pulmonalarteriellen Drucks und der Herzanatomie

Erfasst wurde in den Experimenten der vorliegenden Arbeit der Absolutwert des pulmonalarteriellen Druckes (PAP) in mmHg, welcher nach vollständigem Auswaschen des Blutes bei einer Perfusion von 2ml/min in der steady-state-Phase gemessen wurde. Unter Raumluftbedingungen lag dieser Druck bei den bereits im Vorfeld unter Raumluft (Normoxie) gehaltenen Kontrolltieren bei ca. 8-8,5mmHg. Dieser Wert ist vergleichbar mit publizierten Werten anderer Gruppen, welche zwischen 5 und 15mmHg liegen (41, 77, 78) und legt damit nahe, dass das in den eigenen Versuchen verwendete Messsystem verlässliche Werte wiedergibt.

Interessanterweise zeigte sich in diesen Experimenten keine signifikante Erhöhung des normoxischen PAP in den Knockouttieren für die iNOS bzw. eNOS. Dieses Ergebnis widerspricht, zumindest im Hinblick auf die physiologischerweise im pulmonalarteriellen Endothel konstitutiv exprimierte eNOS, publizierten Daten einer anderen Arbeitsgruppe, wonach ein signifikant erhöhter PAP bei transgenen eNOS-Knockoutmäusen gemessen werden konnte (41). Es muss hier allerdings angemerkt werden, dass jeder dieser transgenen Mausstämme als individuelles Modell anzusehen ist, deren Vergleichbarkeit untereinander als eingeschränkt zu werten ist. Auf diese Problematik wurde auch in vorangegangenen Studien immer wieder eingegangen; so musste beispielsweise für Untersuchungen, welche zu einem frühen Zeitpunkt nach Erzeugung der individuellen Knockoutlinien erstellt wurden, in der Regel auf gekreuzte Hybridstämme zurückgegriffen werden (79). Zudem müssen geschlechtsspezifische Unterschiede der Tiere in den Messungen und Berechnungen berücksichtigt werden (79). In der vorliegenden Arbeit wurde bei allen Versuchen ein ausgewogenes Geschlechterverhältnis angestrebt.

Der basale pulmonalarterielle Druck, der in der isolierten perfundierten Lunge gemessen wurde, ist im Vergleich zur in vivo Situation sehr niedrig, was auch durch die im Modell der isolierten Lunge maximal dilatierten Gefäße hervorgerufen sein kann. Dadurch sind mögliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Mauslinien schwerer detektierbar, was neben der Varianz innerhalb der Knockout-Linien eine weitere Ursache für den fehlenden Unterschied im normoxischen Vasotonus zwischen eNOS-, iNOS- und Wildtypmäusen im Modell der isolierten perfundierten Lunge bei Mäusen darstellen kann.

Für die iNOS ist die Bedeutung des Enzyms für die Regulation des pulmonalen Gefäßtonus grundsätzlich umstritten. Eine Arbeit von Fagan et al. (54) zeigte keinen signifikanten Einfluss des Isoenzyms auf die Intensität der HPV; dies unterstützt auch unsere Beobachtung, wonach keine Steigerung des basalen Gefäßtonus oder der HPV-Stärke in unter normoxischen Bedingungen gehaltenen iNOS-Knockouts im Vergleich zu den Wildtypmäusen darstellbar ist. Laubach et al. konnten jedoch 1998 zeigen (79), dass ein experimentell ausgelöster Endotoxinschock bei iNOS-Knockout-Mäusen zu einem verminderten Überleben dieser transgenen Tiere im Vergleich zu Wildtypmäusen führt. Dies könnte mit einer beschriebenen Rolle der iNOS im Rahmen des septischen Schocks zusammenhängen, wonach eine vollständige Inhibition derselben einen deletären Effekt auf das Überleben bei diesem Krankheitsbild zeigt (80). Auf einem 2013 vorgestellten Kongressbeitrag zeigten Abbasi et al., dass *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) der iNOS mit einem verstärkten Auftreten und höherem Schweregrad einer pulmonalen Hypertonie einhergehen (81); beide Arbeiten deuten also auf einen Beitrag der iNOS zum basalen Vasotonus hin. In einer am Mausmodell erstellten Arbeit schienen iNOS-Knockout-Mäuse nicht anfällig für durch Zigarettenrauch induzierte pulmonale Hypertonie und Lungenemphyseme (82). Es kann vermutet werden, dass die vielschichtige und teils widersprüchliche Rolle der iNOS bei der Regulation des pulmonalarteriellen Drucks / Gefäßtonus zum einen durch ihre unterschiedlich starke Induzierbarkeit durch verschiedene Trigger bzw. Noxen (wie beispielsweise Entzündungsmediatoren, Zigarettenrauch) zustande kommt und zum anderen auch abhängig von der experimentellen Situation unterschiedlich ausfällt, je nachdem ob ein in vivo Modell oder ein Organmodell, wie bei der isoliert perfundierten Mauslunge, verwendet wird.

Ein Knockout der konstitutiv aktiven eNOS zeigt dagegen in der vorliegenden Literatur einen eindeutig vasokonstriktorisches Effekt (41, 42, 64).

Interaktionen zwischen iNOS und eNOS wurden vielfach untersucht (49, 54, 55, 61). Dabei kommt der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) Bedeutung zu (83-85), die nach inflammatorischer Stimulation von iNOS oder von nNOS und eNOS gebildet werden. Durch die Reaktion mit NO zustande kommende Reaktionsprodukte wie Peroxynitrit wird ihre zytotoxische Wirkung und die Eigenschaft des pathogenen Mediators vermittelt (86, 87). Vorausgegangene Arbeiten, die die Bildung von ROS und NO durch iNOS (86, 87) und die Auswirkung von Peroxynitrit auf eNOS untersucht haben (88-90) konnten zeigen, dass unter bestimmten Bedingungen die Wirkung dieses Mediators auf eNOS zu deren Funktionsverlust führt und dabei vom Konzentrationsverhältnis zwischen NO und ROS abhängig ist, was wiederum in engem

Zusammenhang mit der Überexpression von iNOS steht. Die daraus resultierende verminderte Produktion von NO durch eNOS und die deutlich gesteigerte Bildung von ROS vor allem durch die iNOS könnte eine wichtige Rolle bei der Progression einer pulmonalen Hypertonie einnehmen. Als therapeutischer Ansatz konnte hierzu 2008 in der Arbeit von Krug (91) erstmalig gezeigt werden, dass durch pharmakologische selektive Hemmung von iNOS durch ein L-Arginin-Analogon die Ausbildung von eNOS zum Teil wiederhergestellt werden kann.

Im Hypoxie-Model mit nNOS-defizienten Mäusen konnte, wie bereits eingangs beschrieben, kein Einfluss auf die Regulation des pulmonalen Gefäßtonus nachgewiesen werden (55), wesentliche Modulation fand hier nur unter Einfluss des von eNOS und iNOS produzierten NO statt. Ob ein kompensatorischer Regulationsmechanismus unter Einfluss einer iNOS-Überexpression auf die nNOS wie bei der iNOS-eNOS-Interaktion besteht, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Eine Exposition gegenüber chronischer Hypoxie (21 Tage) verursachte sowohl bei Wildtypmäusen wie auch in den iNOS- und eNOS-Knockouttieren eine signifikante Steigerung des pulmonalarteriellen Druckes gegenüber den unter Normalbedingungen gehaltenen Mäusen, wenn diese in der isoliert perfundierten Lunge nach chronischer Hypoxieexposition unter Normoxie gemessen wurden; innerhalb der (Hypoxie-)gruppe war jedoch erneut kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolltieren und Knockout-Mäusen festzustellen. Diese Reaktion der Wildtypmäuse auf chronische Hypoxie ist im Einklang mit Untersuchungen, sowohl an verschiedenen Tieren als auch beim Menschen unter niedrigen Sauerstoffpartialdrücken, wie auch bei Lebewesen welche in großer Höhe leben, zu beobachten, bei denen eine anhaltende Vasokonstriktion, insbesondere aber auch ein Gefäßumbauprozess, induziert wird, der einen erhöhten pulmonalvaskulären Widerstand zur Folge hat (3, 21, 22). In dieser physiologischen Situation könnte die enzymatische Aktivität der NO-Synthasen und damit die Freisetzung von NO über eine Erschlaffung der pulmonalarteriellen Muskulatur alleine zwar der Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie entgegenwirken, über die kompensatorischen Autoregulationsmechanismen trägt sie aber letztlich sogar zur Entstehung einer PH bei. Hierzu konnten 1996 LeCras et al. zeigen, dass auf mRNA- und Proteinebene die Expression sowohl der iNOS als auch der eNOS im Rattenmodell unter chronisch hypoxischen Bedingungen sogar zunahm (92). Die Autoren dieser Studie schlussfolgerten, dass durch die Induktion der NOS-Expression der regulierende Gegeneffekt im Sinne einer negativen Feedbackschleife vorbereitet werden sollte; neuere Studien zeigen zudem, dass die Aktivität der eNOS durch

Protein-Interaktionspartner wie dem Hitzeschockprotein 90 (Hsp90) oder dem *bone morphogenetic protein* (BMP-) Antagonisten Gremlin erforderisabhängig reguliert werden kann (93, 94). Wie bereits zuvor bei den verschiedenen NOS-Isoformen ausführlich diskutiert, wurde auch unter chronisch hypoxischen Bedingungen ein inhibierender Einfluss von freigesetzten reaktiven Sauerstoffspezies auf die Aktivität der NOS beschrieben (95). Diese Ergebnisse können den scheinbaren Widerspruch zwischen veränderter Expression und Aktivität der NOS-Isoformen im untersuchten Modell erklären.

Es stellt sich jedoch die Frage, warum der normoxische, basale pulmonalarterielle Druck in den beiden NOS-Knockouts nicht noch stärker anstieg als in den Kontrolltieren, da der vasodilatierende Effekt und möglicherweise auch ein Anti-Remodeling-Effekt auf die Gefäße in diesen Tieren fehlen oder zumindest reduziert sein müsste. Es kann vermutet werden, dass unter langanhaltender hypoxischer Ventilation eventuell andere Mechanismen der Vasodilatation heraufreguliert werden; so konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine Verringerung der Aktivität der Rho-Kinase den pulmonalarteriellen Gefäßtonus senkt und in Wildtypmäusen eine kompensatorische Heraufregulation der NOS erzeugt (78). Weiterhin präsentierte eine Arbeit aus dem Jahre 2001 Ergebnisse, nach denen eine Hemmung der Phosphodiesterase 5 durch Sildenafil in eNOS-Knockout-Mäusen zu einer teilweisen Umkehr des rechtskardialen Remodeling führte (96); dies zeigt, dass es neben dem eNOS-NO-sGC-cGMP-Weg auch noch alternative Quellen für die Synthese des vasorelaxierenden cGMP geben muss, welche aufgrund der notwendigen Dauer für Transkriptions- und Translationsvorgänge in den zuvor unter Normoxie gehalten Versuchstieren nicht zutage traten, zum Beispiel über (A)NP-NPRA/B-pGC-cGMP. Expressions- und Aktivitätsveränderungen beispielsweise der Rho-Kinase sowie der jeweils alternativen NOS-Isoform oder andere cGMP-Quellen waren in unserem Modell nicht ausgeschlossen und stellen daher alternative Möglichkeiten der Verringerung des pulmonalarteriellen Druckes dar; eine zumindest teilweise Kompensation des eNOS-Ausfalls durch die iNOS wurde beschrieben (61). Es muss zudem erwähnt werden, dass das in der hier vorliegenden Arbeit verwendete Modell der pulmonalarteriellen Druckreaktion Faktoren, welche *in vivo* einen Einfluss auf die Expression oder Aktivität der untersuchten Regulatoren ausübt, nicht in die Reaktivitätsmessungen eingehen können, da die Lunge isoliert untersucht wurde. So beschrieben Nickel et al. (2013), dass eine kurze Exposition von Endothelzellen gegenüber Thrombin (Faktor IIa) eine erhöhte Expression und Aktivität der NOS sowie der GC zur Folge hat, wohingegen

eine längere Exposition die Expression des cGMP-abbauenden Enzyms PDE-5 erhöht (97).

In den Untersuchungen zu anatomischen Veränderungen im Mäuseherzen spiegelten sich im Wesentlichen die Ergebnisse der pulmonalarteriellen Druckmessungen wider. Bei allen Gruppen (Wildtypen sowie iNOS-/eNOS-Knockouts) zeigte sich eine signifikante Zunahme des Quotienten aus rechtem Ventrikel und linkem Ventrikel einschließlich Septum bei unter längerdauernder Hypoxie gehaltenen Mäusen, nicht aber zwischen den Wildtyp- und den Knockout-Mäusen. Dies spricht dafür, dass der gestiegene pulmonalarterielle Druck bei der Hypoxiegruppe über eine vermehrte Druckbelastung des rechten Ventrikels dessen Umbau förderte (sog. „Cor pulmonale“ bei anhaltender, pulmonaler Hypertonie). In der Literatur wird kontrovers diskutiert, ob nicht auch Änderungen der NO-Expression selbst Einfluss auf den Umbau der Herzarchitektur haben könnten (64, 98). Die eigenen Ergebnisse deuten hingegen in eine andere Richtung, da erneut keine größeren Gewichtszunahmen in der Knockoutgruppe im Vergleich zu der Wildtypgruppe nachgewiesen werden konnten. Allerdings sind auch für den rechtsventrikulären Umbau bei pulmonaler Hypertonie zahlreiche alternative Signalwege, so zum Beispiel ebenfalls über die PDE-5, beschrieben worden; diese könnten zumindest partiell den Verlust der NOS bei der Regulation des cGMP-Levels kompensieren (98).

4.2. Die akute hypoxische Vasokonstriktion im NOS-Knockout-Mausmodell

Unter akuter hypoxischer Ventilation zeigte sich in der normoxisch gehaltenen Gruppe eine signifikant stärkere HPV in den eNOS-Knockouts im Vergleich zu den iNOS-Knockouts sowie den Wildtypen. Die Größenordnung des Druckerstiegs in den eNOS-defizienten Mäusen erreichte in den eigenen Experimenten mit knapp 3mmHg allerdings nicht die in der Literatur gemessene Höhe (>4 mmHg). Diese entsprach bei Fagan et al. einer knappen Verdopplung der in den Wildtyp-Kontrolltieren gemessenen Werte (54). Dies bestätigt den eingangs erwähnten Stellenwert der eNOS, nicht jedoch der iNOS, für die HPV im Zuge einer akuten Verringerung des alveolären Sauerstoffpartialdruckes; weiterhin bestätigt es Ergebnisse bereits publizierter Studien (54).

In den nach chronischer Hypoxieexposition untersuchten Wildtyp-Mäusen zeigte sich eine signifikant stärkere Vasokonstriktion nach hypoxischer Ventilation im Vergleich zur normoxisch gehaltenen Kontrollgruppe. Innerhalb der iNOS-Gruppen war die HPV in den Hypoxietieren ebenfalls signifikant stärker. Dies ist am ehesten auf die bereits

heraufregulierten und bereitgestellten Signalmoleküle der vasokonstriktorisches Kaskade in diesen Tieren zurückzuführen – oder auf eine verringerte vasodilatatorische Kapazität. Auf eine mögliche hypoxieabhängige Inhibition der NO-Aktivität durch Protein-Interaktionspartner wie Hsp90 wurde bereits im vorigen Unterkapitel eingegangen (93).

Innerhalb der Hypoxiegruppe war bei den Knockouttieren im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht nur keine erhöhte, sondern im Vergleich zu den Wildtypen eine signifikant geringere HPV-Antwort nachzuweisen. Dies ist zum Beispiel dadurch erklärbar, dass die unter 4.1 beschriebenen, während der anhaltenden Hypoxie hochregulierten Kompensationsmechanismen, wie z.B. Expression von Kalzium- oder Kaliumkanälen oder alternative cGMP-Quellen, den Gefäßtonus bereits so stark reduziert haben, dass ein zusätzlicher hypoxischer Reiz zu einer überschießenden Reaktion im Sinne eines Tonusverlustes der pulmonalarteriellen Muskulatur führt. Über eine reaktive Überexpression der iNOS in eNOS-Knockout-Mäusen wurde, wie oben erwähnt, bereits berichtet (61). In Bezug auf die iNOS selbst bestätigt das Ergebnis zudem den vorab postulierten, protektiven Effekt des iNOS-Knockouts auf die Entstehung einer pulmonalen Hypertonie (82). Eine Messung der exhalativen NO-Konzentration oder der cGMP-Produktion, welche in der hier vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt wurden, könnte über das Vorhandensein und das Wesen solcher alternativer Regulationsmechanismen Aufschluss geben; im Folgenden (4.3. und 4.4.) wird auf diese Frage mittels pharmakologischer Untersuchungen noch näher eingegangen werden.

4.3. Die nicht-hypoxisch induzierte pulmonale Vasokonstriktion im NOS-Knockout-Mausmodell

Um die nicht-hypoxisch induzierte pulmonale Vasokonstriktion zu untersuchen und um einen möglichen spezifischen Effekt der chronischen Hypoxie auf die akute HPV zu determinieren, wurden wiederholte Bolusapplikationen des Thromboxananalogons U-46619 durchgeführt. Die Ventilation erfolgte dabei für die gesamte Versuchsdauer durchgehend mit 21% O₂. Die hierdurch hervorgerufenen Vasokonstriktionen, gemessen an einem Anstieg der pulmonalarteriellen Druckänderungen, waren bei unter normoxischen Bedingungen gehaltenen eNOS-Knockout-Mäusen, wie bereits bei den Experimenten zur akuten hypoxischen Vasokonstriktion, wiederum signifikant stärker als in Wildtypmäusen bzw. iNOS-Knockouts. Dies deutet hin auf Signalwege, die sowohl der HPV als auch der Thromboxan-vermittelten Vasokonstriktion zugrunde

liegen. Eine Erklärungsmöglichkeit wäre, dass der durch das Thromboxanalogon (via IP_3) induzierte, intrazelluläre Kalziumanstieg wegen des Fehlens der eNOS nicht kompensiert werden konnte, während dies bei den hypoxisch induzierten Vasokonstriktionen noch eher möglich war. Somit könnte zum Beispiel eine abgeschwächte Aktivität des Inositolphosphat-Signalweges (oder die Freisetzung vasodilatierender Prostacycline) einen wichtigen Alternativmechanismus zum Erhalt eines niedrigen Vasotonus bei Ausfall der eNOS darstellen; auch dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Resultaten von Fagan et al., welche über die zentrale Bedeutung der eNOS berichtet hatten (64).

Bei allen zuvor 21 Tage unter chronischer Hypoxieexposition gehaltenen Mäusen zeigte sich eine signifikant erhöhte Vasokonstriktion im Vergleich zu den unter Normoxiebedingungen gehaltenen Tieren; dies bestätigt, dass die Balance zwischen Vasokonstriktoren und Vasodilatoren unter chronischer Hypoxie in Richtung Vasokonstriktoren verschoben wird. Vermutlich über eine durch die Applikation des Thromboxanalogons U-46619 bedingte Kalziumfreisetzung, die offenbar unabhängig von der NO-abhängigen Regulation ist, wird der pulmonalarterielle Druck in allen untersuchten Gruppen noch deutlich erhöht.

Klinisch ist dieses Ergebnis insbesondere bei Erkrankungen wie der zystischen Fibrose oder der COPD, deren Gemeinsamkeit die alveoläre Hypoventilation mit konsekutiver pulmonaler Hypertonie und in der Folge der Entstehung eines chronischen Cor pulmonale ist, möglicherweise von Bedeutung. Es bestätigt, dass bei diesen Krankheitsbildern, neben der reduzierten NO-Synthese in Ermangelung von Substrat, andere Regulationsmechanismen des pulmonalen Gefäßtonus eine Rolle spielen und deutet somit auf mögliche pharmakologische Angriffspunkte, die beispielsweise die Kalziumfreisetzung verändern, hin (19).

4.4. Funktionelle Analysen: Hemmung der NO-Synthase sowie der Cyclooxygenase

Schließlich wurden weitergehende funktionelle Analysen vorgenommen, um die beteiligten Regulationswege bei der hypoxischen sowie der nicht-hypoxischen pulmonalen Vasokonstriktion weiter aufzuklären. Für beide Ansätze wurden nun die (verbleibenden) NOS-Isoformen sowie die Cyclooxygenasen mit dem Substratanalogon N^G -Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA, 400 μ M) beziehungsweise D,L-Lysin-mono-acetylsalicylat (ASS, 1mM) gehemmt.

Hierbei zeigte sich, dass unter akuter hypoxischer Ventilation nun deutlich höhere pulmonalarterielle Druckanstiege auftraten; diese unterschieden sich zwischen Wildtypen und NOS-Knockouts nicht signifikant. Beide Ergebnisse überraschen nicht, denn durch Zugabe von L-NMMA war die NO-Synthese in allen Lungen vollständig gehemmt. Da mit ASS ein Isoenzym-unspezifischer Cyclooxygenaseinhibitor verwendet wurde, ist aus den vorliegenden Daten nicht eindeutig zu beantworten, ob die Gabe des Inhibitors die Reaktion durch Verlust von Thromboxan A₂ eher verringerte oder durch den Verlust von vasodilatierenden Prostacyclinen verstärkte. Allerdings weisen publizierte Daten darauf hin, dass eine unspezifische COX-Inhibition die HPV eher zu verstärken scheint, der Verlust der Vasodilatoren, insbesondere PG (I₂), bei kompletter Blockade des Enzyms also schwerer wiegt (99). Somit deutet sich gerade im Vergleich zu den bereits gezeigten Daten (ohne Gabe von Inhibitoren) an, dass ein wesentlicher Alternativweg zur NO-gesteuerten Gegenregulation bei akuter Hypoxie die Freisetzung von vasodilatierenden Prostacyclinen sein könnte (100).

Bei den unter chronischer Hypoxie gehaltenen Mäusen zeigte sich ein etwas differenzierteres Bild. Während die Wildtypmäuse mit einer noch signifikant stärkeren Vasokonstriktion auf die hypoxische Ventilation reagierten, waren bei den Knockoutmäusen kaum höhere (iNOS) oder sogar tendenziell niedrigere Druckanstiege (eNOS) messbar, was allerdings statistisch nicht signifikant war.

Dieses Ergebnis bestätigt die zuvor genannte Hypothese, wonach unter chronischer Hypoxie Veränderungen der Balance zwischen Vasokonstriktoren und -dilatoren als Anpassung auf die Umgebungsbedingungen eine Adaptationsmöglichkeit schaffen könnten. Es ist gut vorstellbar, dass in den Wildtypmäusen eine Heraufregulation der NOS-Isoenzyme stattfindet; deren komplette Blockade durch L-NMMA dann zu der beobachteten extremen Vasokonstriktion führt. Dies konnte bereits durch Arbeiten anderer Autoren belegt werden, welche zeigten, dass eine Applikation von L-NMMA die unkontrollierte Vasodilatation im Rahmen eines septischen Schocks abzumildern vermag (13). Ebenso vermag die Hemmung der COX und dadurch der PG (I₂) zu der starken Vasokonstriktion beizutragen. In den eNOS-Knockouts ist schlüssig, dass die Hemmung der NOS und der Cyclooxygenasen zu keiner weiteren Verstärkung der HPV in chronischer Hypoxie gegenüber den Versuchen in Abwesenheit von NOS und COX führt, da eNOS-NO-sGC-cGMP den wesentlichen Mechanismus der NO-vermittelten Vasodilatation darstellen sollte und dieser in den Knockout-Mäusen bereits gehemmt ist. Offenbar spielt hier im Gegensatz zu den Wildtypmäusen der COX-Signalweg als möglicher vasodilatierender Weg über z.B. PG (I₂)-Bildung eine untergeordnete Rolle. Dies gilt entsprechend für die iNOS-Knockout-Mäuse.

Zu diskutieren für die unterschiedlichen Effekte von LNMMA und ASS in chronisch hypoxischen Tieren sind, wie oben erwähnt, auch alternative cGMP-Quellen oder eine veränderte Expression oder Aktivität von Ionenkanälen der Zellmembran. So konnte beispielsweise im Rattenmodell gezeigt werden, dass die Gabe von Dichloroacetat zu einer Reduktion der chronischen pulmonalen Hypertonie führt (101). Dichloroacetat führt zu einer Heraufregulation von Kaliumkanälen und zu einer Steigerung der Mitochondrien-abhängigen Apoptose-/Proliferationsrate und übt damit einen Anti-Remodeling-Effekt aus (102).

Bezüglich der nicht-hypoxisch induzierten Vasokonstriktion zeigte sich nach Applikation von LNMMA und ASS nur ein schwacher Druckanstieg innerhalb der gesamten Normoxiegruppe, der etwas schwächer ausgeprägt war als im Versuch zur nicht-hypoxisch induzierten Vasokonstriktion ohne Zugabe von Pharmaka. Dies überrascht nicht, da sich die Gabe des Thromboxananalogon U-46619 und die vollständige Hemmung des Thromboxan-Syntheseezyms COX in dieser Gruppe ungefähr aufheben müssten. Passend zu den zuvor erhobenen Daten zeigte sich nun in der unter anhaltender Hypoxie gehaltenen Gruppe erneut ein kräftiger Druckanstieg bei den noch auf den NO-Signalweg angewiesenen Wildtypen, während die eNOS-/iNOS-Knockouts den Druckanstieg erneut über alternative Regulationsmechanismen kompensierten.

In der Zusammenschau kann zur Beantwortung der eingangs formulierten Hypothesen gesagt werden, dass der eNOS-/iNOS-Knockout keinen signifikanten Einfluss auf den normoxischen pulmonalarteriellen Druck (*base PAP*) im Vergleich zu Wildtypen hat; eine anhaltende Hypoxie führt jedoch zu einer signifikanten Zunahme des dann unter Normoxie gemessenen PAP. Dieser erhöhte pulmonalvaskuläre Widerstand führt zu einer Gewichtszunahme des rechten Herzventrikels im Sinne eines „Cor pulmonale“.

Bei unter Normalbedingungen gehaltenen Mäusen bestehen nahezu keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und iNOS-Knockout-Mäusen in der Antwort auf akut hypoxisch oder nicht-hypoxisch induzierte pulmonale Vasokonstriktionen, in eNOS-Knockoutmäusen ist jedoch jeweils ein stärkerer pulmonalarterieller Druckanstieg zu messen, was zum einen den Stellenwert der eNOS als Antagonist und Modulator für die akute HPV bestätigt und zum anderen auf die Beteiligung der eNOS an weiteren Signalwegen, die der Thromboxan-vermittelten Vasokonstriktion zugrunde liegen, hinweist. Der größte Druckanstieg innerhalb der „Normoxiegruppe“ war nach pharmakologischer Ausschaltung der (Rest-) NOS sowie der COX zu beobachten. Dies ist vermutlich durch das Vorhandensein zahlreicher gleichberechtigter Regelkreisläufe,

unabhängig von den NO-Synthasen, oder die kompensatorische Hochregulation anderer NOS-Isoformen in den Knockout-Tieren bedingt. Nach chronischer Hypoxieexposition wird die HPV in Wildtyp- und transgenen iNOS-Mäusen stärker, was zur Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie beitragen kann. Dies scheint ein mausspeziesspezifischer Effekt zu sein, da in Untersuchungen am Kaninchen genau gegensätzliche Ergebnisse gewonnen wurden: bei ihnen war die HPV-Reaktion in chronisch hypoxisch gehaltenen Tieren niedriger als in Kaninchen, die unter normoxischen Bedingungen lebten. Die verstärkte Reaktion auf die akute hypoxische Ventilation nach chronischer Hypoxie zeigt, dass es in der Wildtypmaus generell zu einer verstärkten Vasoreaktivität nach chronischer Hypoxie kommt. Beide Beobachtungen, sowohl die Abschwächung, als auch die Verstärkung der HPV, sind in teleologischem Sinne interpretierbar. Eine Abschwächung führt zu einem verminderten pulmonalen Gefäßtonus unter Hypoxie und somit zu einer geringeren pulmonalen Hypertonie. Eine Verstärkung macht über ein verbessertes Belüftungs-/Perfusionsverhältnis (V/Q matching) unter Hypoxie Sinn, um die Feinabstimmung des Gasaustausches zu optimieren. Bei den 21 Tage unter Hypoxiebedingungen gehaltenen Knockout-, nicht jedoch den Wildtypmäusen, zeigte sich hingegen die Ausbildung eines Kompensationsmechanismus unabhängig von der NOS-Expression, welcher erneut nur durch Gabe des Thromboxanalogon überwunden werden konnte. Das Auftauchen dieses Effekts nach 21 Tagen deutet auf Expressionsänderungen beteiligter Proteine, so zum Beispiel am Kalziumstoffwechsel beteiligter Kanalproteine, hin. Eine Hochregulation alternativer NOS-Isoformen kann hingegen ausgeschlossen werden, da diese Kompensation unter akuter Hypoxie trotz Gabe des NOS-Substratanalogons L-NMMA zu beobachten war.

5. Zusammenfassung

5.1. In deutscher Sprache

Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV) ist ein Regulationsmechanismus, der durch eine gezielte Vasokonstriktion in schlecht belüfteten Lungenanteilen eine Umverteilung des Blutes in besser belüftete Areale ermöglicht und hierdurch einen effektiven Gasaustausch begünstigt. Diese Vasokonstriktion wird durch Signalmoleküle wie Thromboxan oder Prostacyclin, Änderungen der intrazellulären Ionenkonzentrationen oder lösliche Mediatoren wie Stickstoffmonoxid (NO) reguliert; NO wird durch verschiedene Isoformen der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) erzeugt. In der vorliegenden Arbeit wurde am Modell der isolierten perfundierten Mauslunge von Knockouttieren der induzierbaren (iNOS) bzw. endothelialen (eNOS) Stickstoffmonoxid-Synthase sowie Wildtypmäusen die pulmonalarterielle Vasokonstriktion auf physikalische (Hypoxie) sowie pharmakologische vasokonstriktorische Stimuli (Thromboxanmimetikum U-46619) sowie Auswirkungen auf die Masse des rechten Herzventrikels untersucht. Es zeigte sich, dass der eNOS- und der iNOS-Knockout keinen signifikanten Einfluss auf den normoxischen pulmonalarteriellen Druck (=Gefäßwiderstand) hat; eine chronische Hypoxie (21 Tage/10% O₂) jedoch zu einem signifikanten pulmonalarteriellen Druckanstieg (pulmonale Hypertonie) führt, der sich in einer Gewichtszunahme des rechten Herzventrikels im Sinne eines „Cor pulmonale“ widerspiegelt. Bei unter Normalbedingungen gehaltenen Mäusen bestanden keine Unterschiede zwischen Wildtypmäusen und iNOS-Knockout-Mäusen bezüglich akut hypoxisch oder nicht-hypoxisch induzierter pulmonaler Vasokonstriktionen. Dies ist vermutlich durch alternative Regelkreisläufe / kompensatorische Regulationsmechanismen bedingt. Ein signifikant höherer Druckanstieg war nur bei eNOS-Knockout-Mäusen, sowohl als Reaktion auf eine akute hypoxische Ventilation, als auch auf die Gabe eines Thromboxananalogons zu beobachten, was zum einen den Stellenwert der eNOS als Aktivator und Modulator der HPV bestätigt und zum anderen auf die Beteiligung der eNOS an weiteren Signalwegen, die der Thromboxan-vermittelten Vasokonstriktion zugrunde liegen, hinweist. Bei unter chronischer Hypoxie gehaltenen Knockout-Mäusen zeigten sich Kompensationsmechanismen, die unter Stimulation mit dem Thromboxanmimetikum (U-46619) verstärkt wurden, damit offenbar Thromboxan-sensitiv sind, und die möglicherweise durch Aktivitäts- bzw. Expressionsänderungen von Kanalproteinen oder die Beteiligung anderer Enzymsysteme mitbedingt sind. Auf

eine, durch eine Hochregulation durch alternative NOS-Isoformen bedingte, Kompensation ergab sich allerdings kein Hinweis, da der Effekt auch nach Gabe eines NOS-Inhibitors (L-NMMA) zu beobachten war.

Die Ergebnisse unterstreichen einerseits den zentralen Stellenwert der eNOS bei der Regulation der akuten hypoxischen Vasokonstriktion, weisen aber andererseits unter anhaltender (chronischer) Hypoxie auf das Vorhandensein eNOS-unabhängiger Kompensationsmechanismen z.B. über die bereits beschriebenen veränderten Ionenkanalaktivitäten wie auch über Peptid-gesteuerte (via (A)NP-NPRA/B-pGC) oder Prostaglandin-gesteuerte cGMP-Bildung hin, die eine Vasodilatation trotz fehlendem oder zumindest reduziertem NO bei eNOS-Defizienz ermöglichen können. Diese Mechanismen können in der klinischen Praxis als therapeutische Ansätze bei Erkrankungen dienen, die durch eine anhaltende alveoläre Hypoventilation gekennzeichnet sind.

5.2. In englischer Sprache

The term hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) describes a regulatory mechanism that redistributes blood flow from poorly to well-ventilated lung areas in support of an effective gas exchange. The pulmonary vascular tone is, among others, regulated by thromboxane and prostacyclin as well as changes in intracellular ion concentrations or soluble messengers like nitric oxide (NO). The latter is synthesized by various isoforms of the nitric oxide synthase (NOS). In this thesis, changes in pulmonary arterial pressure (PAP, reflecting pulmonary vascular resistance) and changes in right heart weight upon various physical (hypoxia) and pharmacological (U-46619 = thromboxane mimetic) stimuli in murine knockout models for the endothelial and inducible NOS isoforms (eNOS, iNOS) as well as wildtype controls were investigated, using an isolated perfused lung system. It was found that the absence of both eNOS or iNOS had no significant effect on baseline PAP; however, long-term hypoxia led to a significant increase in PAP as well as in the weight of the right cardiac ventricle, reflecting the development of a *cor pulmonale*. Mice that were kept under standard conditions showed no differences in hypoxia- or non-hypoxia-induced vasoconstrictions irrespective of their genotype. This finding might be due to the presence of alternative or compensatory regulatory mechanisms. A significant increase in pulmonary arterial pressure was only found in eNOS-knockouts in response to acute hypoxic ventilation as well as application of a thromboxane mimetic. This confirms the predominant role of eNOS in activating and modulating acute HPV and shows its participation in other pathways depending on the thromboxane-mediated vasoconstriction. Knockout mice

that had been kept under chronic hypoxia before the experiments developed after pharmacological thromboxane mimetic-stimulation (U-46619) a thromboxane-sensitive compensation mechanism that might be due to activation and / or altered expression of membrane ion channels or participation of alternative enzymatic pathways. There was no indication for upregulated alternative NOS-isoforms to be responsible for these compensation mechanisms, because the effect was also seen after using a NOS-inhibiting substrate analogon (L-NMMA).

The results underline the central importance of eNOS in modulating acute hypoxic vasoconstriction and are indicative for eNOS-independent compensatory mechanisms of vasodilatation under chronic hypoxia such as activation of ion channels or cGMP triggering mechanisms like ANP or prostaglandines. These mechanisms have possible clinical relevance in patients with chronic alveolar hypoxia-related lung disease.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AdCMVceNOS	Adenoviraler Expressionsvektor für die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ARDS	Acute respiratory distress syndrome
ASS	D,L-Lysin-mono-acetylsalicylat/ Glycin, Aspisol®
BMP	Bone morphogenetic protein
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX1/2	Cyclooxygenase, Isoenzym 1/2
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
DMSO	Dimethylsulfoxid
(s)GC	(lösliche) Guanylatcyclase
(p)GC	(membrangebundene) Guanylatcyclase
(c)GMP	(zyklisches) Guanosinmonophosphat
HAES	Hydroxyethylstärke
HIF-1	Hypoxie induzierter Faktor - 1
H ₂ O	Wasser
HPV	Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion
Hsp90	Heat shock protein 90
kg/ KG	Kilogramm/ Körpergewicht

L-NMMA	N ^G -Monomethyl-L-Arginin
LV/ LVP	Linker Ventrikel/ linksventrikulärer Druck
n	Natürliche Zahl
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
NO	Stickstoffmonoxid
(e/i/n)NOS	(endotheliale/induzierbare/neuronale)Stickstoffmonoxid-Synthase
(A)NP	(Atrial) Natriuretic peptide
NPR(A/B)	Natriuretic peptide receptor Typ A/B
ns	Nicht signifikant (p>0,05)
O ₂	Sauerstoff
p-Wert	Signifikanzwert
PAF(R)	Platelet activating factor (receptor)
(base) PAP	Pulmonalarterieller Basisdruck (basal Pulmonal arterial pressure)
PASMC(s)	Pulmonalarterielle glatte Muskelzellen (Pulmonal arterial smooth muscle cell(s))
PBS	Phosphate buffered saline
PDE-5	Phosphodiesterase, Isoenzym 5
PEEP	Positiver endexpiratorischer Druck (Positive endexpiratory pressure)
PG (I ₂)	Prostaglandin (Isotyp I ₂)

pH-Wert	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität (dimensionslose Zahl); Maß für den sauren oder basischen Charakter einer wässrigen Lösung
Ppleu	Pleuraler Druck
PPV	Positive pressure ventilation
(m)RNA	(messenger) Ribonukleinsäure
ROCK	Rho-Kinase
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RV	Rechter Ventrikel
S	(kardiales) Kammerseptum
SEM	Standard Error of the Mean; Standardfehler
SNP	Single nucleotide polymorphism
SOCE	Store operated calcium channels
U-46619	Synthetisches Thromboxanmimetikum
VEGF(R)	Vascular endothelial growth factor (receptor)
VOCE	Voltage operated calcium channels
Vol.	Volumenprozent
V/Q matching	Belüftungs-/ Perfusionsverhältnis
WT	Wildtyp

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schemadarstellung der Regulation des Gefäßtonus durch NO und des Angriffspunktes eines zentralen pharmakologischen Modulators **10**

Abbildung 2: Absoluter pulmonalarterieller Druck (PAP) gemessen in artifiziell perfundierten Lungen nach Erreichen der Steady-State-Phase unter normoxischer Beatmung **25**

Abbildung 3: Quotient der Gewichte aus rechtem Ventrikel / linkem Ventrikel mit Septum in Wildtypmäusen (control), iNOS- und eNOS-Knockout-Mäusen unter norm- (21% O₂) und hypoxischen (21 Tage 10% Vol./Vol. O₂, 0% CO₂, Differenz zu 100%: N₂) Bedingungen (Normoxia / Hypoxia) **26**

Abbildung 4: Absolutgewichte (weight) des rechten Ventrikels (RV) und des linken Ventrikels mit Septum interventriculare (LV) in Wildtypmäusen (control) und iNOS-Knockout-Mäusen unter norm- (21% O₂) und hypoxischen (21 Tage 10% Vol./Vol. O₂, 0% CO₂, Differenz zu 100%: N₂) Bedingungen (Normoxia / Hypoxia) **27**

Abbildung 5: Absolutgewichte (weight) des rechten Ventrikels (RV) und des linken Ventrikels mit Septum interventriculare (LV) in Wildtypmäusen (control) und eNOS-Knockout-Mäusen unter norm- (21% O₂) und hypoxischen (21 Tage 10% Vol./Vol. O₂, 0% CO₂, Differenz zu 100%: N₂) Bedingungen (Normoxia / Hypoxia) **28**

Abbildung 6: Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion unter akuter hypoxischer Ventilation (10min 3% O₂) nach chronischer Hypoxieexposition der Mäuse (21 Tage, 10 % O₂) im Vergleich zu normoxisch gehaltenen Mäusen **29**

Abbildung 7: Die Stärke der pulmonalen Vasokonstriktion nach Applikation des Thromboxanmimetikums U-46619	31
--	-----------

Abbildung 8: Die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion unter akuter hypoxischer Ventilation (10min 3% O ₂) und Hemmung der Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) durch N ^G -Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) sowie der Cyclooxygenasen (COX) durch D,L-Lysin-mono-acetylsalicylat (ASS)	33
--	-----------

Abbildung 9: Die Stärke der pulmonalen Vasokonstriktion nach Applikation des Thromboxanmimetikums U-46619 und Hemmung der Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) durch N ^G -Monomethyl-L-Arginin (L-NMMA) sowie der Cyclooxygenasen (COX) durch D,L-Lysin-mono-acetylsalicylat (ASS)	35
---	-----------

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Experimentelle Agenzien und Pharmaka	12
--	-----------

Tabelle 2: Vergleich der HPV-Stärke <u>innerhalb</u> einer Tiergruppe nach deren Haltung unter hypoxischen versus normoxischen Bedingungen in Experimenten ohne und mit (-/+) Zugabe von L-NMMA/ASS	36
--	-----------

Tabelle 3: Vergleich der HPV-Stärke <u>zwischen</u> den Tiergruppen nach deren Haltung unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen in Experimenten ohne und mit (-/+) Zugabe von L-NMMA/ASS	36
--	-----------

Tabelle 4: Vergleich der Stärke der Vasokonstriktion nach U-46619 Gabe <u>innerhalb</u> einer Tiergruppe nach deren Haltung unter hypoxischen versus normoxischen Bedingungen in Experimenten ohne und mit (-/+) Zugabe von L-NMMA/ASS	37
---	-----------

Tabelle 5: Vergleich der Stärke der Vasokonstriktion nach U-46619 Gabe <u>zwischen</u> den Tiergruppen nach deren Haltung unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen in Experimenten ohne und mit (-/+) Zugabe von L-NMMA/ASS	37
---	-----------

8. Literaturverzeichnis

1. von Euler U & Liljestrand G. Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat. *Acta Physiologica Scandinavica* 1946; 12: 301-320.
2. Sylvester JT, Shimoda LA, Aaronson PI & Ward JPT. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiological Reviews* 2012; 92: 367-520.
3. Grover RF. Pulmonary circulation in animals and man at high altitude. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1965; 127: 632-639.
4. Moudgil R, Michelakis ED & Archer SL. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Journal of Applied Physiology* 2005; 98: 390-403.
5. Kuhr FK, Zimnicka AM, Skidgel RA, Christman JW, Yuan JX-J & Levitan I. Kinins and kinin receptors in pulmonary vasoconstriction and vascular remodeling. *The FASEB Journal* 2012; 26: 671-678.
6. Aaronson PI, Robertson TP, Knock GA, Becker S, Lewis TH, Snetkov V & Ward JPT. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: mechanisms and controversies. *The Journal of Physiology* 2006; 570: 53-58.
7. Voelkel NF. Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *The American review of respiratory disease* 1986; 133: 1186-1195.
8. Weir EK & Archer SL. The mechanism of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction: the tale of two channels. *FASEB J* 1995; 9: 183-189.
9. Ward JPT & Aaronson PI. Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction: can anyone be right? *Respiration physiology* 1999; 115: 261-271.
10. Schittny J & Burri P. Anatomie des Respirationstraktes. Rieger C, Hardt H von der, Sennhauser FH, Wahn U, Zach M (Hrsg.) *Pädiatrische Pneumologie*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York 1999: 17-28.
11. Staub NC. Site of hypoxic pulmonary vasoconstriction. *CHEST Journal* 1985; 88: 240-245.
12. Marshall BE, Marshall C, Magno M, Lilagan P & Pietra GG. Influence of bronchial arterial PO₂ on pulmonary vascular resistance. *J Appl Physiol* 1991; 70: 405-415.
13. Fischer SR, Deyo DJ, Bone HG, McGuire R, Traber LD & Traber DL. Nitric oxide synthase inhibition restores hypoxic pulmonary vasoconstriction in sepsis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1997; 156: 833-839.

14. McCormack DG & Paterson N. Loss of hypoxic pulmonary vasoconstriction in chronic pneumonia is not mediated by nitric oxide. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 1993; 265: H1523-1528.
15. Rouby J-J, Puybasset L, Cluzel P, Richecoeur J, Lu Q & Grenier P. Regional distribution of gas and tissue in acute respiratory distress syndrome. II. Physiological correlations and definition of an ARDS Severity Score. *Intensive care medicine* 2000; 26: 1046-1056.
16. Daoud FS, Reeves JT & Schaefer JW. Failure of hypoxic pulmonary vasoconstriction in patients with liver cirrhosis. *Journal of Clinical Investigation* 1972; 51: 1076-1080.
17. Lorente JA, Landín L, De Pablo R, Renes E & Liste D. L-arginine pathway in the sepsis syndrome. *Critical care medicine* 1993; 21: 1287-1295.
18. Stenmark KR & Mcmurtry IF. Vascular remodeling versus vasoconstriction in chronic hypoxic pulmonary hypertension: a time for reappraisal? *Circulation research* 2005; 97: 95-98.
19. Michael J, Kennedy T, Fitzpatrick S & Rosenstein B. Nifedipine inhibits hypoxic pulmonary vasoconstriction during rest and exercise in patients with cystic fibrosis and cor pulmonale. *The American review of respiratory disease* 1984; 130: 516-519.
20. Dzau VJ, Packer M, Lilly LS, Swartz SL, Hollenberg NK & Williams GH. Prostaglandins in severe congestive heart failure: relation to activation of the renin-angiotensin system and hyponatremia. *New England Journal of Medicine* 1984; 310: 347-352.
21. Grover RF, Reeves JT, Will DH & Blount SG. Pulmonary vasoconstriction in steers at high altitude. *Journal of Applied Physiology* 1963; 18: 567-574.
22. Ge R-L, Kubo K, Kobayashi T, Sekiguchi M & Honda T. Blunted hypoxic pulmonary vasoconstrictive response in the rodent *Ochotona curzoniae* (pika) at high altitude. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 1998; 274: H1792-1799.
23. Weissmann N, Grimminger F, Olschewski A, Seeger W. Hypoxic pulmonary vasoconstriction: a multifactorial response? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001; 281: L314-317.
24. Salvaterra CG, Goldman WF. Acute hypoxia increases cytosolic calcium in cultured pulmonary arterial myocytes. *Am J Physiol* 1993; 264: L323-328.

25. Vaclula MS, Kleinman JG, Madden JA. Effect of hypoxia and norepinephrine on cytoplasmic free Ca^{2+} in pulmonary and cerebral arterial myocytes. *Am J Physiol* 1993; 265: L591-597.
26. Wang J, Shimoda LA, Weigand L, Wang W, Sun D, Sylvester JT. Acute hypoxia increases intracellular Ca^{2+} in pulmonary arterial smooth muscle by enhancing capacitative Ca^{2+} entry. *Am J Physiol* 2005; 288: L1059-1069.
27. McMurtry IF, Davidson AB, Reeves JT & Grover RF. Inhibition of hypoxic pulmonary vasoconstriction by calcium antagonists in isolated rat lungs. *Circ Res* 1976; 38: 99-104.
28. Weissmann N, Dietrich A, Fuchs B, Kalwa H, Ay M, Dumitrascu R, Olschewski A, Storch U, Mederos y Schnitzler M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Pinkenburg O, Seeger W, Grimminger F, Gudermann T. Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103:19093-19098.
29. Weissmann N, Winterhalder S, Nollen M, Voswinckel R, Ghofrani HA, Schermuly RT, Quanz K, Seeger W, Grimminger F. Sustained alveolar hypoxia induces a biphasic vasoconstriction and elevates subsequent normoxic vascular tone in intact rabbit lungs. 1999
30. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, Maclean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF & Rabinovitch M. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* 2004; 43: 13-24.
31. Wenger RH, Gassmann M. Environmental stress and gene regulation. edited by Sorey KB. BIOS Scientific Publishers. Oxford 1999; 25-45.
32. Buhiraja R, Tudor RM & Hassoun PM. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* 2004; 109: 159-165.
33. Frostell C, Fratacci M, Wain J, Jones R & Zapol W. Inhaled nitric oxide. A selective pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Circulation* 1991; 83: 2038-2047.
34. Frostell CG, Blomqvist H, Hedenstierna G, Lundberg J & Zapol WM. Inhaled nitric oxide selectively reverses human hypoxic pulmonary vasoconstriction without causing systemic vasodilation. *Anesthesiology* 1993; 78: 427-435.
35. Änggård E. Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *The Lancet* 1994; 343: 1199-1206.

36. Palmer RM, Ashton DS & Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333: 664-666.
37. Sparacino-Watkins CE, Lai Y-C & Gladwin MT. Nitrate–Nitrite–Nitric Oxide Pathway in Pulmonary Arterial Hypertension Therapeutics. *Circulation* 2012; 125: 2824-2826.
38. Benjamin N, O'driscoll F, Dougall H, Duncan C, Smith L, Golden M & Mckenzie H. Stomach NO synthesis. *Nature* 1994; 368: 502-502.
39. Bjorne HH, Petersson J, Phillipson M, Weitzberg E, Holm L & Lundberg JO. Nitrite in saliva increases gastric mucosal blood flow and mucus thickness. *J Clin Invest* 2004; 113: 106-114.
40. Janssens SP, Bloch KD, Nong Z, Gerard RD, Zoldhelyi P & Collen D. Adenoviral-mediated transfer of the human endothelial nitric oxide synthase gene reduces acute hypoxic pulmonary vasoconstriction in rats. *Journal of Clinical Investigation* 1996; 98: 317-324.
41. Steudel W, Ichinose F, Huang PL, Hurford WE, Jones RC, Bevan JA, Fishman MC & Zapol WM. Pulmonary vasoconstriction and hypertension in mice with targeted disruption of the endothelial nitric oxide synthase (NOS 3) gene. *Circulation Research* 1997; 81: 34-41.
42. Steudel W, Scherrer-Crosbie M, Bloch KD, Weimann J, Huang PL, Jones RC, Picard MH & Zapol WM. Sustained pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy after chronic hypoxia in mice with congenital deficiency of nitric oxide synthase 3. *Journal of Clinical Investigation* 1998; 101: 2468-2477.
43. Kantrow SP, Huang YC, Whorton AR, Grayck EN, Knight JM, Millington DS & Piantadosi CA. Hypoxia inhibits nitric oxide synthesis in isolated rabbit lung. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 1997; 272: L1167-1173.
44. Mcquillan L, Leung G, Marsden P, Kostyk S & Kourembanas S. Hypoxia inhibits expression of eNOS via transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 1994; 267: H1921-1927.
45. Arnal J-F, Yamin J, Dockery S & Harrison DG. Regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA, protein, and activity during cell growth. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 1994; 267: C1381-1388.

46. Giaid A & Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *New England Journal of Medicine* 1995; 333: 214-221.
47. Stamler JS, Loh E, Roddy MA, Currie KE & Creager MA. Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. *Circulation* 1994; 89: 2035-2040.
48. Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P & Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1992; 89: 6348-6352.
49. Förstermann U, Nakane M, Tracey WR & Pollock JS. Isoforms of nitric oxide synthase: functions in the cardiovascular system. *European heart journal* 1993; 14 Suppl I: 10-15.
50. May O. 2014. eNOS, Vascular Endothelial Health, and CVD [Online]. Available: <https://www.caymanchem.com/images/articles/page/2185-2.jpg>.
51. Squadrito GL & Pryor WA. Oxidative chemistry of nitric oxide: the roles of superoxide, peroxynitrite, and carbon dioxide. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 392-403.
52. Xue C & Johns RA. Endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1995; 333: 1642-1644.
53. Xue C & Johns RA. Upregulation of Nitric Oxide Synthase Correlates Temporally With Onset of Pulmonary Vascular Remodeling in the Hypoxic Rat. *Hypertension* 1996; 28: 743-753.
54. Fagan KA, Tyler RC, Sato K, Fouty BW, Morris KG, Huang PL, Mcmurtry IF & Rodman DM. Relative contributions of endothelial, inducible, and neuronal NOS to tone in the murine pulmonary circulation. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 1999; 277: L472-478.
55. Le Cras TD, Xue C, Rengasamy A & Johns RA. Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 1996; 270: L164-170.
56. Di Rosa M, Radomski M, Carnuccio R & Moncada S. Glucocorticoids inhibit the induction of nitric synthase in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990; 172: 1246-1252.

57. Radomski M, Palmer RM & Moncada S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *Proc Natl Sci USA*. 1990; 87: 10043-10047.
58. Xie Q & Nathan C. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J Leukoc Biol*. 1994; 56: 576-582.
59. MacMicking J, Xie QW & Nathan C. Nitric oxide an macrophage function. *Annu Rev Immunol*. 1997; 15: 323-350.
60. Kiemer AK & Vollmar AM. Autocrine regulation of inducible nitric-oxide synthase in macrophages by atrial natriuretic peptide. *J Biol Chem*. 1998; 273: 13444-13451.
61. Cook S, Vollenweider P, Ménard B, Egli M, Nicod P & Scherrer U. Increased eNO and pulmonary iNOS expression in eNOS null mice. *European Respiratory Journal* 2003; 21: 770-773.
62. Ollerstam A, Pittner J, Persson AE & Thorup C. Increased blood pressure in rats after long-term inhibition of the neuronal isoform of nitric oxide synthase. *The Journal of Clinical Investigation* 1997; 99: 2212-2218.
63. Grimminger F, Priestersbach R, Weissmann N, Walmrath D & Seeger W. Nitric oxide generation and hypoxic vasoconstriction in buffer-perfused rabbit lungs. *Journal of Applied Physiology* 1995; 78: 1509-1515.
64. Fagan KA, Fouty BW, Tyler RC, Morris KG, Hepler LK, Sato K, Lecras TD, Abman SH, Weinberger HD & Huang PL. The pulmonary circulation of homozygous or heterozygous eNOS-null mice is hyperresponsive to mild hypoxia. *Journal of Clinical Investigation* 1999; 103: 291-299.
65. Deem S, Swenson ER, Alberts MK, Hedges RG & Bishop MJ. Red-blood-cell augmentation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: hematocrit dependence and the importance of nitric oxide. *American journal of respiratory and critical care medicine* 1998; 157: 1181-1186.
66. Kylhammar D & Rådegran G. Cyclooxygenase-2 inhibition and thromboxane A2 receptor antagonism attenuate hypoxic pulmonary vasoconstriction in a porcine model. *Acta Physiologica* 2012; 205: 507-519.
67. Su CL, Yuan DW, Chiang LL, Lee HL, Chen KH & Wang D. Inducible cyclooxygenase expression mediating hypoxia/reoxygenation-induced pulmonary vasoconstriction is attenuated by a cyclooxygenase inhibitor in rats. *Transplant Proc* 2012; 44: 929-32.

68. Brimioulle S, Lejeune P, Vachieri JL, Delcroix M, Hallemans R, Leeman M & Naeije R. Stimulus-response curve of hypoxic pulmonary vasoconstriction in intact dogs: effects of ASA. *Journal of Applied Physiology* 1994; 77: 476-480.
69. Rubin LJ, Hughes JD & Lazar JD. The effects of eicosanoid synthesis inhibitors on normoxic and hypoxic pulmonary vascular tone in dogs. *The American review of respiratory disease* 1985; 132: 93-98.
70. Huang PL, Dawson TM, Bredt DS, Snyder SH & Fishman MC. Targeted disruption of the neuronal nitric oxide synthase gene. *Cell* 1993; 75: 1273-1286.
71. Knowlton F & Starling E. The influence of variations in temperature and blood-pressure on the performance of the isolated mammalian heart. *The Journal of physiology* 1912; 44: 206-219.
72. Bayliss L, Müller E & Starling E. The action of insulin and sugar on the respiratory quotient and metabolism of the heart-lung preparation. *The Journal of physiology* 1928; 65: 33-47.
73. Schudt C, Hatzelmann A, Beume R & Tenor H. Phosphodiesterase inhibitors: history of pharmacology. *Phosphodiesterases as Drug Targets. Handb Exp Pharmacol.* 2011; 1-46.
74. Fuchs B, Sommer N, Dietrich A, Schermuly RT, Ghofrani HA, Grimminger F, Seeger W, Gudermann T & Weissmann N. Redox signaling and reactive oxygen species in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Respiratory physiology & neurobiology* 2010; 174: 282-291.
75. Fuchs B, Rupp M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Seeger W, Grimminger F, Gudermann T, Dietrich A & Weissmann N. Diacylglycerol regulates acute hypoxic pulmonary vasoconstriction via TRPC6. *Respiratory research* 2011; 12: 20-20.
76. Yoo HY, Zeifman A, Ko EA, Smith KA, Chen J, Machado RF, Zhao Y-Y, Minshall RD & Yuan JX-J. Optimization of isolated perfused/ventilated mouse lung to study hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Pulmonary circulation* 2013; 3: 396-405.
77. Nagaya N, Kangawa K, Kanda M, Uematsu M, Horio T, Fukuyama N, Hino J, Harada-Shiba M, Okumura H, Tabata Y, Mochizuki N, Chiba Y, Nishioka K, Miyatake K, Asahara T, Hara H & Mori H. Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. *Circulation* 2003; 108: 889-895.

78. Fagan KA, Oka M, Bauer NR, Gebb SA, Ivy DD, Morris KG & Mcmurtry IF. Attenuation of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction and hypoxic pulmonary hypertension in mice by inhibition of Rho-kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 287: L656-664.
79. Laubach VE, Foley PL, Shockey KS, Tribble CG & Kron IL. Protective roles of nitric oxide and testosterone in endotoxemia: evidence from NOS-2-deficient mice. *Am J Physiol* 1998; 275: H2211-2218.
80. Nava E, Palmer R & Moncada S. Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock: how much is beneficial? *The Lancet* 1991; 338: 1555-1557.
81. Abbasi T, Patel S, Desai A, Wade M, Cavallari L, Garcia J, Machado R & Duarte J. Variation in inducible nitric-oxide synthase is associated with increased severity of pulmonary hypertension in patients with diastolic dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 187: A2554.
82. Seimetz M, Parajuli N, Pichl A, Veit F, Kwapiszewska G, Weisel FC, Milger K, Egemazarov B, Turowska A & Fuchs B. Inducible NOS inhibition reverses tobacco-smoke-induced emphysema and pulmonary hypertension in mice. *Cell* 2011; 147: 293-305.
83. Fang FC. Mechanisms of nitric-oxide related antimicrobial activity. *J Clin Invest* 1997; 99: 2818-2825.
84. Weissmann N, Voswinckel R, Hardebusch T, Rosseau S, Ghofrani HA, Schermuly R, Seeger W & Grimminger F. Evidence for role of protein kinase c in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Am J Physiol* 1999; 276: L90-95.
85. Wolin SM, Burke-Wolin TM & Mohazzab-H KM. Roles for NAD(P)H oxidases and reactive oxygen species in vascular oxygen sensing mechanisms. *Respir Physiol* 1999; 115: 229-238.
86. Xia Y & Zweier JL. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 6954-6958.
87. Xia Y, Roman LJ, Masters BS & Zweier JL. Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain. *J Biol Chem* 1998; 273: 22635-22639.
88. Kuzkaya N, Weissmann N, Harrison DG & Dikalov S. Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem* 2003; 278: 22546-22554.

89. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE & Harrison DG. Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J Clin Invest* 2003; 111: 1201-1209.
90. Milstien S & Katusic Z. Oxidation of tetrahydrobiopterin in peroxynitrite: implications for vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 263: 681-684.
91. Krug C. Effekt der selektiven Hemmung der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) in einem experimentellen Model der Pulmonalen Hypertonie. <http://www.geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2008/6599/>.
92. Le Cras TD, Xue C, Rengasamy A & Johns RA. Chronic hypoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 1996; 270: L164-170.
93. Morio Y, Nagaoka T, Seyama K, Takahashi K & Kuriyama S. Influence of heat shock protein 90 on endothelial nitric oxide synthase activity and vascular reactivity in chronically hypoxic rat lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185: A3426.
94. Cahill E, Mcloughlin P & Coyle-Rowan S. The bmp antagonist gremlin contributes to pathological remodelling of the hypoxic pulmonary vasculature by reducing eNOS expression and activity. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 187: A2256.
95. Fike CD, Dikalova A, Slaughter JC, Kaplowitz M, Zhang Y & Aschner JL. Reactive oxygen species-reducing strategies improve pulmonary arterial responses to nitric oxide in piglets with chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Antioxidants & redox signaling* 2013; 18: 1727-1738.
96. Zhao L, Mason NA, Morrell NW, Kojonazarov B, Sadykov A, Maripov A, Mirrakhimov MM, Aldashev A & Wilkins MR. Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2001; 104: 424-428.
97. Nickel KF, Laux V, Heumann R & Von Degenfeld G. Thrombin has biphasic effects on the nitric oxide cGMP pathway in endothelial cells and contributes to experimental pulmonary hypertension. *PLoS ONE* 2013; 8: e63504.
98. Klinger JR, Abman SH & Gladwin MT. Nitric oxide deficiency and endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension. *Am J of Respiratory and Critical Care Med*. 2013; 188: 639-646.

99. Leeman M, De Beyer VZ, Biarent D, Maggiorini M, Mélot C & Naeije R. Inhibition of cyclooxygenase and nitric oxide synthase in hypoxic vasoconstriction and oleic acid-induced lung injury. *Am J of Respiratory and Critical Care Med.* 1999; 159: 1383-1390.
100. Bihari D, Smithies M, Gimson A & Tinker J. The effects of vasodilation with prostacyclin on oxygen delivery and uptake in critically ill patients. *New England Journal of Medicine* 1987; 317: 397-403.
101. Michelakis ED, McMurtry MS, Wu X-C, Dyck JRB, Moudgil R, Hopkins TA, Lopaschuk GD, Puttagunta L, Waite R & Archer SL. Dichloroacetate, a metabolic modulator, prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats: role of increased expression and activity of voltage-gated potassium channels. *Circulation* 2002; 105: 244-250.
102. McMurtry MS, Bonnet S, Wu X, Dyck JR, Haromy A, Hashimoto K, Michelakis ED. Dichloroacetate prevents and reverses pulmonary hypertension by inducing pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis. *Circulation* 2004; 95: 830-840.

9. Publikationsverzeichnis

Weissmann N, Manz D, Buchspies D, Keller S, Mehling T, Voswinckel R, Quanz K, Ghofrani HA, Schermuly RT, Fink L, Seeger W, Gassmann M, Grimminger F. Congenital erythropoietin over-expression causes "anti-pulmonary hypertensive" structural and functional changes in mice, both in normoxia and hypoxia. Thrombosis and Haemostasis 2005; 94: 630-638.

10. Ehrenwörtliche Erklärung

"Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus- Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck der Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht, Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Münster, 25.10.2017

Daniela Schüler

11. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Norbert Weißmann für die Überlassung des Dissertationsthemas, die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente, der Diskussion der Ergebnisse und der Abfassung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Werner Seeger danke ich für die Möglichkeit die vorliegende Arbeit am Zentrum für Innere Medizin durchführen zu können.

Frau Karin Quanz danke ich für die Anleitung zu den Experimenten und die technische Assistenz.